



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica- DISIT

*Corso di Laurea in Biologia*

*Indirizzo biomedico e biomolecolare*

*PROVA FINALE*

*Valutazione di differenti variabili pre-analitiche per campioni urinari da sottoporre ad analisi qPCR per la determinazione di biomarcatori del tumore della vescica*

Relatore: Prof. Elia Ranzato  
Correlatore: Dott. Giulio Mengozzi

**Candidata: Valentina Crisavola**

**Anno Accademico 2023/2024**

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>CAPITOLO 1</b> .....                                  | 3  |
| <b>INTRODUZIONE</b> .....                                | 3  |
| 1.1 Il laboratorio e la fase preanalitica.....           | 3  |
| 1.2 Gli stadi della fase pre analitica .....             | 6  |
| 1.3 Errori associati alla fase pre-analitica.....        | 8  |
| 1.4 Variabili preanalitiche e controlli di qualità.....  | 10 |
| 1.5 Matrice considerata.....                             | 11 |
| 1.6 Tumore della vescica .....                           | 12 |
| 1.6.1 <i>Epidemiologia e fattori di rischio</i> .....    | 12 |
| 1.6.2 <i>Diagnosi</i> .....                              | 13 |
| 1.7 Biomarcatori del tumore della vescica.....           | 15 |
| 1.7.1 <i>Biomarcatori considerati nello studio</i> ..... | 16 |
| 1.8 Design of Experiment .....                           | 17 |
| <b>CAPITOLO 2</b> .....                                  | 20 |
| 2.1 Obiettivo della tesi .....                           | 20 |
| 2.2 Variabili considerate nello studio .....             | 20 |
| <b>CAPITOLO 3</b> .....                                  | 22 |
| <b>MATERIALI E METODI</b> .....                          | 22 |
| 3.1 Popolazione di studio.....                           | 22 |
| 3.2 Estrattore automatico Kairos-96 .....                | 23 |
| 3.3 RT-PCR Real Time.....                                | 29 |
| 3.4 Preparazione dei campioni .....                      | 33 |
| 3.5 Analisi Statistica .....                             | 34 |
| <b>CAPITOLO 4</b> .....                                  | 35 |
| <b>RISULTATI</b> .....                                   | 35 |
| <b>CAPITOLO 5</b> .....                                  | 53 |
| <b>DISCUSSIONE</b> .....                                 | 53 |
| <b>CAPITOLO 6</b> .....                                  | 58 |
| <b>CONCLUSIONI</b> .....                                 | 58 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....                                | 59 |
| <b>SITOGRAFIA</b> .....                                  | 61 |
| <b>RINGRAZIAMENTI</b> .....                              | 62 |

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 Il laboratorio e la fase preanalitica

Un laboratorio di analisi cliniche è il luogo in cui vengono eseguiti metodi di indagine e attività di ricerca su campioni biologici (sangue, plasma, siero, urine, ecc.) utilizzando attrezzature, dispositivi biomedici, materiali e prodotti chimici. Le analisi cliniche sono i principali strumenti impiegati da medici e operatori sanitari per confermare o escludere una diagnosi, scegliere la terapia più adatta per il paziente e monitorarne lo stato di salute.

Un laboratorio riveste, quindi, un ruolo essenziale nel supportare l'assistenza sanitaria primaria attraverso indagini, controllo e prevenzione delle principali malattie nel paese.

Il processo di analisi complessivo (TTP – Total Testing Process), in figura 1, comprende una serie di attività che iniziano con la decisione del medico di eseguire degli esami, la raccolta del campione, il suo trasporto al laboratorio, l'analisi del campione, l'invio dei risultati e l'interpretazione e la decisione definitiva da parte del medico. L'accuratezza dei risultati diagnostici è di primaria importanza in quanto funge da base per le decisioni sanitarie e l'assistenza ai pazienti.

Le attività di laboratorio si riassumono, così, in 3 fasi:

- fase pre-analitica
- fase analitica
- fase post-analitica

tutte strettamente necessarie e importanti per arrivare ad avere informazioni sullo stato di salute del paziente.

Oggi l'attenzione è principalmente rivolta all'ottimizzazione della fase pre-analitica, che presenta il maggior numero di errori e può potenzialmente causare gravi danni al paziente. Questa fase rappresenta, infatti, in media circa il 57% dell'intera procedura, dal paziente al risultato analitico,

e include tutte le operazioni preliminari necessarie prima che un campione possa essere effettivamente analizzato in laboratorio.

Questa fase include: l'indicazione, l'informazione e l'identificazione del paziente, il prelievo del campione, il suo successivo trasporto e la conservazione fino al momento in cui viene inoltrato al laboratorio per l'analisi. Numerose sono le possibilità di influenzare e alterare i risultati dell'analisi durante ogni fase di questo processo. Sebbene la fase pre-analitica sia considerata una procedura di facile esecuzione, circa il 60-70% degli errori si concentra proprio in questa fase. Possono verificarsi errori di identificazione del paziente, errate etichettature dei campioni, conservazione e trasporto inadeguati. Questa fase è critica poiché soggetta a molteplici variabili che possono compromettere la qualità del campione e influenzare l'esito dei test, causando risultati inaccurati e scorretti. (1)

Variabili come il timing della raccolta e la scelta della matrice più adeguata sono fondamentali da considerare per garantire risultati affidabili. Spesso le cause di errori possono essere legate a condizioni di elevato numero di campioni trattati, a una filiera di processo non sempre ben definita e organizzata, e a comportamenti professionali non sempre orientati alla sicurezza. Queste situazioni aumentano la possibilità che l'esito dell'analisi del campione non venga correttamente collegato al paziente da cui proviene. Per ridurre e/o evitare errori nella fase pre-analitica, è fondamentale conoscere a fondo tutto il processo che costituisce la procedura dal prelievo del campione, alla corretta identificazione del paziente fino alla conservazione e al trasporto dei campioni stessi.

Esistono procedure standard definite per le fasi che avvengono al di fuori del controllo del laboratorio, come la modalità e la sequenza di raccolta dei campioni, l'uso di contenitori appropriati e il loro trasporto. La precisione del risultato analitico dipende dalla preservazione delle caratteristiche chimiche, biologiche e morfologiche del campione durante il processo.

Esiste un processo di automazione mirato a ridurre al minimo l'intervento umano durante le fasi analitiche di lavoro nei laboratori clinici. I nuovi macchinari hanno sostituito in gran parte l'intervento umano nei processi produttivi, portando a notevoli benefici rispetto al passato. Questi benefici includono un aumento della produttività e una riduzione degli errori durante l'identificazione e l'analisi dei campioni.

L'automazione dei test nel laboratorio consente un'attività di lavorazione 24 ore su 24 con una

ripetibilità accurata dei test, escludendo gli errori umani dovuti alla stanchezza o ad altri fattori.

Nonostante la crescente consapevolezza dei laboratoristi, gli errori preanalitici rimangono una preoccupazione significativa nella pratica di laboratorio, contribuendo a una parte sostanziale degli errori totali di laboratorio. Affrontare questi problemi è essenziale per garantire la qualità dei test di laboratorio e migliorare i risultati delle cure dei pazienti. (2).

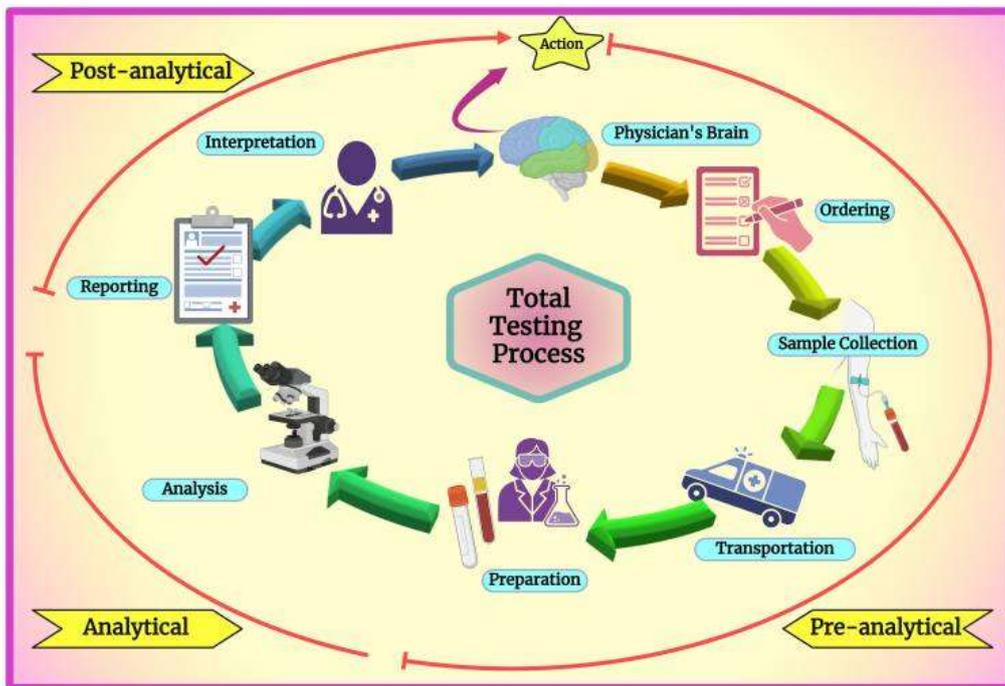


Figura 1. Processo di analisi complessivo TTP (Total Testing Process).

## 1.2 Gli stadi della fase pre analitica

La fase pre-analitica inizia con la richiesta dell'esame da parte di un medico clinico. Successivamente, si procede alla raccolta del campione. Una volta raccolto, il campione viene etichettato e trasportato al laboratorio, dove viene identificato e preparato per la fase analitica. Qui di seguito, esamineremo più nel dettaglio i passaggi che compongono la fase pre-analitica.

### *Richiesta del Clinico*

Il clinico prescrive gli esami formulando un sospetto diagnostico e richiede quelli ritenuti più appropriati, mantenendo un equilibrio tra la quantità delle analisi e la gestione efficiente delle risorse sanitarie. Già in questa fase, viene avviata la tracciabilità del campione, che sarà fondamentale per valutare l'efficacia del processo analitico. Ad esempio, attraverso il calcolo del TAT (Turn Around Time), si potrà determinare il tempo totale impiegato per completare l'analisi, fornendo così indicazioni sulla tempestività e l'efficienza del servizio di laboratorio.

### *Identificazione ed etichettatura*

Prima della raccolta, le fasi coinvolte sono la corretta identificazione del paziente e l'etichettatura delle provette. Dopo l'inserimento della richiesta nel sistema informativo del laboratorio, viene associato un codice a barre al contenitore utilizzato per il campione. Questo codice a barre contiene informazioni dettagliate per l'identificazione del paziente e dei test da eseguire.

### *Prelievo*

Per ottenere informazioni clinicamente utili dall'indagine di laboratorio, è essenziale che il materiale biologico raccolto sia appropriato, ovvero rappresentativo della patologia oggetto dell'indagine. Inoltre, è fondamentale che il campione venga raccolto in modo da evitare contaminazioni e che sia prelevato in quantità sufficiente per garantire un test diagnostico di

qualità. La raccolta di una quantità insufficiente di campione potrebbe infatti portare a risultati falsi-negativi o alla necessità di ripetere il campionamento. Una volta prelevato, il campione viene adeguatamente confezionato per essere trasportato al centro di analisi, dove sarà sottoposto all'analisi vera e propria.

### *Trasporto*

Il trasporto del campione avviene tramite un sistema di corrieri o mezzi automatizzati e deve rispettare alcuni requisiti fondamentali:

- I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati per garantirne l'integrità e la stabilità durante il trasporto.
- Il trasporto deve avvenire entro un intervallo di tempo appropriato in base alla tipologia di esame richiesto, con un tempo massimo garantito (ad esempio, il TAT garantito è di 2 ore in generale).
- Il campione deve essere conservato all'interno di un determinato range di temperatura per preservarne le caratteristiche biologiche e chimiche.
- Il trasporto deve avvenire nel massimo della sicurezza, al fine di prevenire rischi biologici e proteggere gli addetti al trasporto da eventuali danni o contaminazioni.

### *Check-in, Pre-lavorazione, Check-out*

Una volta che il campione arriva a destinazione, viene eseguito il check-in all'interno della struttura di analisi. Il campione viene identificato attraverso la lettura del codice a barre e vengono registrati la data e l'ora del suo ingresso nel laboratorio. Successivamente, il campione viene accettato e viene verificato che le fasi di prelievo, trasporto e conservazione siano state eseguite correttamente, rispettando i criteri di conformità. Il campione potrebbe presentare danni, coagulazione, emolisi o diluizione, ad esempio. A questo punto, il campione potrebbe essere sottoposto a una fase di pre-lavorazione, di solito una pre-centrifugazione, prima di essere avviato al processo analitico vero e proprio al momento del check-out.

### 1.3 Errori associati alla fase pre-analitica

È noto che la maggior parte delle fonti di errore in ambito laboratoristico è attribuibile alla fase preanalitica. Le principali cause di errore in questa fase includono:

- Richiesta di test inappropriati:

La prescrizione di esami di laboratorio non necessari (sovrautilizzo) o l'assenza di test necessari (sottoutilizzo) rappresenta una fonte significativa di errore. Le richieste di esami inappropriati incidono sui costi totali e aumentano il rischio di errori medici (3). Le stime relative agli esami di laboratorio inappropriati variano considerevolmente: tra l'11% e il 70% per gli esami biochimici ed ematologici generali, e tra il 5% e il 95% per gli esami delle urine e della microbiologia. (4)

- Preparazione del paziente

Il digiuno rappresenta una delle preparazioni fondamentali per il paziente prima della raccolta dei campioni. È indispensabile per alcuni test, come quelli relativi ai livelli di glucosio e colesterolo. L'assunzione di cibo provoca significative alterazioni metaboliche e ormonali, principalmente a causa dell'assorbimento di liquidi, macronutrienti e altri componenti alimentari (5).

La durata del digiuno varia tra 8 e 12 ore, a seconda del tipo di test richiesto. Un digiuno non adeguato può causare valori falsamente elevati di diversi analiti.

- Raccolta del campione

Il processo di raccolta dei campioni è cruciale poiché può essere responsabile della maggior parte degli errori preanalitici. Questo include:

L'etichettatura accurata del campione e l'identificazione corretta del paziente; l'adozione di tecniche di raccolta appropriate; il trasporto adeguato dei campioni prima della loro analisi.

- Etichettatura ed identificazione del paziente

È stato stabilito che il 16% degli errori nel processo di flebotomia è dovuto a un'errata identificazione del paziente, mentre il 56% è attribuibile a un'etichettatura non corretta.

- Variazione diurna

La tempistica del prelievo del sangue è cruciale a causa delle variazioni giornaliere di analiti come il cortisolo e l'adrenocorticotropina (ACTH), si consiglia, infatti, di raccogliere i campioni di sangue al mattino, poiché molti analiti con variazioni diurne hanno i loro valori di riferimento massimi tra le 7 e le 9 del mattino.

- Ordine di prelievo

Quando si prelevano campioni di sangue utilizzando diverse tipologie di provette, è importante seguire un ordine specifico. Si inizia con le provette per emocoltura o sterile, seguite dalle provette lisce o con gel, e infine dalle provette contenenti additivi come eparina, acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), inibitore glicolitico o fluoruro.

- Manipolazione, trasporto e conservazione

L'instabilità degli analiti, un aspetto critico della qualità del campione, è influenzata dalla sua manipolazione, compreso il tempo e la temperatura durante il trasporto e la conservazione. Un campione di sangue intero richiede di essere centrifugato entro due ore dal prelievo. Dopo la separazione, il campione rimane generalmente stabile a temperatura ambiente per otto ore e fino a 48 ore se conservato a 2-4 °C. Passate le 48 ore, il siero deve essere congelato a -20 °C per mantenere la stabilità. È essenziale che il laboratorio abbia procedure per monitorare il tempo e la temperatura, e specificare un limite di tempo tra il prelievo del campione e l'analisi (6).

Lo scopo è quello di ridurre il carryover della contaminazione da additivi, che può portare a risultati errati.

## 1.4 Variabili preanalitiche e controlli di qualità

La sfida del controllo di qualità (CQ) preanalitico risiede nel fatto che, a differenza del CQ analitico, la maggior parte delle fasi del processo si svolge al di fuori del laboratorio analitico. Queste fasi sono gestite da una varietà di professionisti (medici, infermieri, trasportatori, ecc.) e mancano di protocolli definiti, linee guida o procedure operative standard, con possibilità di monitoraggio limitate per il laboratorio stesso. Tuttavia, esistono diverse strategie che ogni laboratorio clinico dovrebbe implementare per mantenere o migliorare l'elevata qualità dell'intero processo analitico.

A differenza del controllo di qualità nei test di laboratorio, le variabili preanalitiche, che possono influenzare i risultati dei test, possono essere raccolte e documentate sotto forma di indicatori chiave di prestazione (Key Performance Indicators), noti come indicatori di qualità (QI). Questi QI generalmente riflettono i tassi di errore preanalitico, come il numero di campioni identificati erroneamente, il numero di campioni coagulati, il numero di campioni emolizzati e così via. Analogamente ad altri KPI, i QI preanalitici devono essere facilmente recuperabili automaticamente, devono essere rilevanti per il miglioramento della qualità dei test, devono avere criteri di accettabilità ben definiti e azioni specifiche da intraprendere in caso di deviazione da tali criteri.

Oltre al controllo di qualità interno giornaliero, è essenziale verificare la correttezza dei risultati mediante un controllo esterno della qualità. Negli ultimi anni, la maggior parte dei fornitori di verifica esterna di qualità (VEQ) ha integrato schemi preanalitici, offrendo sondaggi online con domande relative a situazioni preanalitiche ipotetiche o distribuendo campioni preanalitici alterati. (7).

## 1.5 Matrice considerata

Nell'ambito delle matrici biologiche, il sangue, la saliva e l'urina sono tra le più rilevanti, ma vanno considerate anche altre matrici come il liquido amniotico, il plasma seminale e matrice cheratinica. Il sangue e le sue frazioni prive di cellule, come il siero e il plasma, sono fondamentali negli studi clinici, poiché offrono informazioni essenziali sulle condizioni fisiologiche e patologiche del corpo umano.

La matrice ematica, o plasma sanguigno, è la componente liquida del sangue in cui sono sospese le cellule ematiche, composta da acqua, elettroliti, proteine, ormoni, prodotti di scarto e altri soluti, il plasma costituisce circa il 55% del volume totale del sangue e svolge diverse funzioni: trasporto, rimozione dei rifiuti, regolazione ed immunità. Questo tipo di matrice è essenziale per l'omeostasi e la salute generale, svolgendo un ruolo chiave nella diagnostica e negli interventi terapeutici, tuttavia, ha diverse complessità, in particolare nella preparazione dei campioni di sangue che può introdurre interferenze che ostacolano l'identificazione e la quantificazione degli analiti, compromettendo la stabilità e la composizione dei metaboliti.

La saliva è una matrice biologica che si raccoglie facilmente; il prelievo non compromette l'integrità del corpo umano ed è quindi più facilmente approvato dalle commissioni etiche. La conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni di saliva sono meno complessi rispetto a quelli del sangue, ma esiste il rischio di contaminazione esterna e la finestra di rilevamento è breve. (8).

La scelta della matrice urinaria è stata anche motivata dalla sua relativa semplicità e non invasività della raccolta, si deve ricordare però che l'urina è un fluido biologico a composizione chimica estremamente variabile che riflette lo stato metabolico del soggetto ed è influenzato da fattori dietetici, stato di idratazione e presenza di farmaci e loro metaboliti, questo significa che le condizioni analitiche sono variabili in funzione dell'effetto matrice del campione. L'urina, inoltre, è un fluido biologico instabile nel quale, a temperatura ambiente, diversi costituenti vanno incontro a significativi cambiamenti nel tempo. Il pH ad esempio, può variare in modo significativo, glucosio e bilirubina possono diminuire o scomparire, leucociti ed eritrociti possono deteriorarsi e non essere più riconoscibili. Sebbene presenti alcuni svantaggi, come l'elevato tasso di

contaminazione, essa offre numerosi vantaggi rispetto alla matrice sanguigna. Questi vantaggi includono la facilità di raccolta, la possibilità di analizzare sia le sostanze che i loro metaboliti, la capacità di campionare volumi elevati, e la presenza di cellule esfoliate importanti per l'analisi. La raccolta della matrice urinaria deve avvenire in ambienti privi di possibili fonti di contaminazione del campione, come acqua, saponi o detersivi di qualsiasi tipo. Il materiale utilizzato per la raccolta deve essere integro e sigillato fino al momento della consegna al soggetto interessato. (20)

## 1.6 Tumore della vescica

### *1.6.1 Epidemiologia e fattori di rischio*

In Italia nel 2023 sono stati stimati circa 29.700 nuovi casi di tumore vescicale a cellule transizionali (TCC), considerando sia le forme superficiali che quelle infiltranti, nelle quali il tumore ha raggiunto lo strato muscolare della vescica. Di questi nuovi casi, 23.700 riguardavano uomini e 6.000 donne. La sopravvivenza a 5 anni in Italia è di circa l'80%, sebbene vi sia una frequente probabilità di recidiva, ovvero la ricomparsa del tumore anche a distanza di tempo.

Negli ultimi anni, si è osservato un aumento della sua incidenza, particolarmente in Asia, Nord Africa ed Europa Centrale. Le previsioni future indicano che dal 2020 al 2040 i maggiori incrementi percentuali di tumore della vescica saranno prevalentemente in Africa, America Latina, Asia e Oceania.

Il cancro della vescica è diagnosticato quattro volte più frequentemente negli uomini rispetto alle donne, e la mortalità è anch'essa circa quattro volte maggiore negli uomini. Inoltre, il rischio relativo di morte per cancro della vescica tra i fumatori è più elevato negli uomini rispetto alle donne.

Il principale fattore di rischio per il carcinoma della vescica è il fumo di sigaretta. Il rischio di sviluppare questa neoplasia è ulteriormente aumentato dall'esposizione cronica alle ammine aromatiche e alle nitrosamine, come la benzidina e la betanaftilammina, comuni nei lavoratori

delle industrie tessili, dei coloranti, della gomma e del cuoio; l'esposizione a tinture per capelli, a prodotti vernicianti, a fumi del diesel e a composti organici possono aumentare il rischio poiché, questi composti causano la formazione di addotti nel DNA, portando a mutazioni genetiche permanenti, le mutazioni indotte possono attivare oncogeni o sopprimere geni oncosoppressori, contribuendo allo sviluppo del tumore vescicale.

Il sesso e l'età sono due caratteristiche epidemiologiche chiave associate allo sviluppo del cancro della vescica. Gli uomini sono più comunemente colpiti dalla malattia, con un rapporto maschi/femmine che rimane relativamente stabile a circa 4:1 il tumore della vescica è il 6° tumore più comune negli uomini in tutto il mondo e il 4° negli Stati Uniti. Sono state proposte diverse spiegazioni, tra cui le differenze nei tassi di fumo e l'esposizione a composti specifici negli ambienti di lavoro, i fattori ormonali e gli effetti dei cromosomi sessuali. Il cancro della vescica colpisce più comunemente le persone anziane, con un'età media alla diagnosi di 73 anni e in più del 90% dei casi si verifica in persone di età superiore ai 55 anni.

Altri fattori di rischio includono: trattamenti radioterapici che coinvolgono la regione pelvica, l'uso di farmaci come ciclofosfamide e ifosfamide, l'infezione da parassiti come lo *Schistosoma haematobium*, diffuso in alcuni paesi del Medio Oriente, in particolare in Egitto; l'alimentazione ha un ruolo rilevante: un consumo elevato di cibi fritti e grassi è associato a un rischio maggiore di sviluppare il carcinoma della vescica.

### *1.6.2 Diagnosi*

La citologia urinaria rappresenta il solo metodo diagnostico urinario utilizzato per l'individuazione del carcinoma della vescica di alto grado. Sebbene la sensibilità di questo esame sia subottimale, la sua specificità è elevata, in particolare per il carcinoma uroteliale di alto grado, pertanto, la citologia urinaria continua a essere considerata il gold standard nella diagnosi del carcinoma vescicale. (9).

Negli ultimi decenni, sono stati compiuti notevoli progressi nello sviluppo di test urinari basati su proteine e altre molecole per la diagnosi del cancro della vescica. Questi sforzi hanno portato all'approvazione di numerosi test da parte della FDA, anche se molti di questi test offrono una maggiore sensibilità rispetto alla citologia urinaria nell'individuazione del carcinoma della vescica,

essi sono spesso limitati da una specificità inferiore, da risultati falsi positivi e dal fatto che le migliori performances dei marcatori si ottengano nei casi di tumori di alto grado. L'analisi di campioni provenienti da biopsia o TURBT (resezione transuretrale del tumore della vescica) al momento della cistoscopia è il metodo più comune di diagnosi iniziale.(10) , (11).

Per quanto riguarda la cistoscopia, questo è un esame endoscopico utilizzato per monitorare lo stato della vescica e dell'uretra, e permette di esaminare meglio le pareti interne di questi organi per verificare lesioni e per diagnosticare eventuali patologie. Durante la procedura viene inserito nella vescica un cistoscopio, uno strumento sottile a fibre ottiche dotato di telecamera necessario per l'indagine diagnostica. Questo tipo di esame può essere utile per determinare le cause di frequenti infezioni del tratto urinario ed è raccomandata in caso di sintomi come presenza di sangue nelle urine, ma è anche impiegato per rimuovere piccoli tumori della vescica e prelevare piccoli campioni di tessuto per l'analisi istologica.

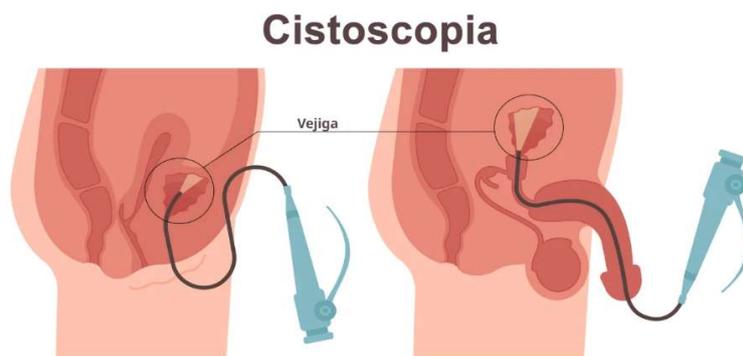


Figura 2.Processo di cistoscopia, l'esame endoscopico principale per l'identificazione di lesioni o patologie a livello vescicale, che prevede l'utilizzo di un cistoscopio.

L'esame patologico dei campioni prelevati dalla vescica conferma la presenza del tumore, ne determina il tipo istologico e ne stabilisce lo stadio. Il carcinoma vescicale è classificato in categorie di basso e alto grado; quelli di basso grado tendono a recidivare frequentemente, ma presentano una limitata tendenza alla progressione. (12).

Il sintomo più comune del carcinoma vescicale è la presenza di sangue nelle urine, nota come ematuria. Tra i sintomi meno frequenti vi sono l'aumento della frequenza urinaria e la sensazione di bruciore durante la minzione. Nei casi in cui il tumore raggiunge uno stadio avanzato e si diffonde, i sintomi possono includere dolore pelvico, dolore osseo e perdita di peso. (13).

## 1.7 Biomarcatori del tumore della vescica

Il tasso di recidiva del carcinoma della vescica a cellule transizionali è compreso tra il 50% e il 70%. L'elenco delle tecniche proposte per il rilevamento di questa neoplasia è in continua espansione e l'interesse per l'applicazione di metodi più accurati e meno costosi è notevolmente aumentato. Oltre alla cistoscopia e alla citologia urinaria, che sono considerate le tecniche gold standard per la diagnosi di questo tumore, recenti studi molecolari hanno evidenziato l'efficacia dell'analisi dell'espressione di mRNA su liquidi biologici non solo per la diagnosi, ma anche per il follow-up dei pazienti con carcinoma della vescica. Un aspetto interessante di questa tecnica, oltre alla sua accuratezza, è ad esempio la possibilità di analizzare campioni di urina, rendendola un approccio non invasivo. Sono stati identificati molti geni con funzioni diverse in qualità di marcatori urinari per il carcinoma della vescica e il loro utilizzo durante il monitoraggio sarebbe utile per ridurre al minimo la frequenza delle cistoscopie. (14).

I marcatori urinari per la rilevazione del carcinoma della vescica sono stati oggetto di ricerca per decenni. L'idea che l'urina, essendo in costante contatto con il tessuto tumorale, possa fornire informazioni dettagliate sul tumore stesso rimane un concetto promettente. La ricerca in questo ambito ha portato alla scoperta di una vasta gamma di marcatori urinari, ciascuno con vari gradi di validazione clinica. Tuttavia, nonostante il numero considerevole di marcatori urinari identificati e gli sforzi significativi nella ricerca e sviluppo di test clinicamente validi, l'adozione di questi marcatori nella pratica clinica rimane limitata. (15).

Le problematiche legate alla definizione delle prestazioni dei marcatori sono, infatti, molteplici. Spesso, i metodi analitici disponibili per i nuovi marcatori identificati non ne consentono l'utilizzo routinario a causa sia della mancanza di standardizzazione nella raccolta dei campioni urinari che rende impossibile il confronto tra dati provenienti da differenti laboratori analisi o centri di ricerca,

sia della mancanza di automazione che implica quindi costi elevati e lunghe procedure pre-analitiche. È stato, inoltre, ampiamente dimostrato che l'utilizzo di un singolo biomarcatore non garantisce prestazioni diagnostiche sufficienti.

### *1.7.1 Biomarcatori considerati nello studio*

1. **Citocheratine:** sono un gruppo di proteine che fanno parte dei filamenti intermedi, tipicamente presenti nelle cellule epiteliali specializzate che rivestono numerose superfici interne ed esterne del corpo. Queste proteine forniscono supporto strutturale, proteggendo le cellule dallo stress meccanico, e aiutano a mantenere la loro forma e funzione. Le citocheratine sono comunemente espresse in molti tipi di tumori originati dalle cellule epiteliali, sono ampiamente utilizzate come marcatori per identificare e classificare diversi tipi di cellule epiteliali, rivestendo un ruolo fondamentale nella diagnosi e nella classificazione di vari tipi di cancro. (21).

1.1 **CK20**, citocheratina 20, è una citocheratina acida di tipo I a basso peso molecolare. L'analisi immunoistochimica dell'espressione di CK20 è diventata una pratica standard per valutare le biopsie della vescica e migliorare l'identificazione delle cellule uroteliali neoplastiche, si è evidenziato come CK20 mostri una sensibilità elevata, con un aumento dell'espressione particolarmente evidente nei +-tumori non muscolo-invasivi in correlazione con il loro grado, ed è anche associata alla probabilità di recidiva, tuttavia, l'espressione di CK20 tende a diminuire quando si verifica una crescita muscolo-invasiva del tumore. (16).

1.2 **CK7**, nota anche come citocheratina 7, è un altro filamento intermedio rilevato nella neoplasia uroteliale del tumore della vescica. Si tratta di una citocheratina basica, la cui colorazione immunoistochimica con la CK20 ha dimostrato essere un utile strumento diagnostico per distinguere l'origine dei tumori vescicali, particolarmente nei casi di tumori metastatici, infatti si è dimostrato come CK20 sia tipicamente osservata nelle metastasi del tumore primario della vescica, mentre CK7, sia espressa sia nel tumore primario che nelle metastasi.

La sensibilità della rilevazione di CK7 per i tumori di basso e alto grado era

rispettivamente del 90 e del 95%, rispetto al 15 e all'80% ottenuto dalla citologia, la rilevazione di CK7 per gli stadi precoci del tumore è elevata quanto quella per i tumori in fase avanzata. (17).

## **2. Trascrittasi inversa della telomerasi (TERT)**

Le mutazioni nel promotore della telomerasi trascrittasi inversa (TERT) rappresentano le modificazioni genetiche più comuni riscontrate nel cancro della vescica. Queste mutazioni sono uniformemente distribuite tra i vari gradi e stadi della malattia e sono considerate eventi precoci nella formazione del cancro. Alcuni studi hanno confermato la presenza di mutazioni nel promotore TERT nel DNA delle cellule esfoliate dall'epitelio vescicale urinario.

Vi sono due mutazioni principali nella regione promotrice del gene della telomerasi trascrittasi inversa (TERT), note come C228T e C250T, che sono frequentemente osservate in diversi tipi di tumore. Queste mutazioni sono rilevate con alta frequenza (60-85%) in tutti gli stadi e gradi della malattia, sono considerate eventi precoci nella tumorigenesi e sono state identificate nel DNA di campioni di urina raccolti sia al momento della diagnosi clinica primaria sia durante i follow-up post-chirurgici. Inoltre, si è dimostrata un'elevata sensibilità e specificità per tutti i tipi di tumori della vescica, superando significativamente la citologia urinaria. Questo è dovuto alla capacità di rilevare anche le condizioni precoci di tumore. La capacità di identificare queste mutazioni nei campioni di urina fino a dieci anni prima della diagnosi del tumore alla vescica mostra una sensibilità del 47% con una specificità del 100%. Questi risultati evidenziano che le mutazioni nel promotore del TERT nel campione urinario hanno il potenziale per essere utilizzate come biomarcatori non invasivi per la diagnosi precoce del tumore della vescica. (18).

## **1.8 Design of Experiment**

Il Design of Experiments (DOE), sviluppato negli anni '20 dallo scienziato inglese R.A. Fisher, è un metodo statistico utilizzato per ottimizzare l'estrazione di informazioni dai dati sperimentali.

Il DOE è un metodo di progettazione ed esecuzione di esperimenti basato sull'analisi statistica, con

l'obiettivo di definire le relazioni tra un insieme di variabili in ingresso.

Il suo obiettivo è ottenere modelli previsionali che descrivano le correlazioni tra variabili in ingresso e variabili in uscita. Questo approccio consente di ottenere importanti vantaggi, tra cui:

- Riduzione delle prove sperimentali
- Uso più efficace delle risorse
- Maggiore affidabilità dei processi

Il Design of Experiments (DOE), a seconda del numero di fattori iniziali, può essere utilizzato sia come strumento di screening (valutando esclusivamente la significatività dei singoli fattori per ridurre il campo di analisi) sia come strumento di ottimizzazione (analizzando non solo l'influenza dei singoli fattori, ma anche le interazioni tra i fattori).

I benefici del DOE e le sue potenzialità possono essere sintetizzate in tre punti:

1. Determinare le poche variabili che maggiormente influenzano le risposte.
2. Individuare i fattori controllabili per permettere un'interazione correlata con la risposta dell'esperimento.
3. Quantificare l'influenza delle variabili controllabili sulla variabile di risposta (y) e creare il modello matematico.

## **GLI STEP OPERATIVI**

1. Definire l'obiettivo: l'obiettivo sarà generalmente quello di massimizzare una risposta, minimizzarla o raggiungere un valore specifico.
2. Definire il processo e selezionare i fattori da studiare: stabilire i limiti del processo da sperimentare, esaminare e controllare tutte le fonti di variabilità conosciute o previste per l'esperimento.

3. Selezionare una risposta e un sistema di misurazione: le risposte sono i risultati di un esperimento. Nell'analisi di un disegno sperimentale, è possibile misurare tutte le risposte desiderate; un buon sistema di misurazione deve essere accurato, ripetibile, riproducibile, stabile e lineare. La raccolta di campioni di qualità è cruciale per il sistema di misurazione.
4. Selezionare il disegno sperimentale: il tipo di disegno dipende dal numero di fattori da studiare, dalle risorse disponibili e dal livello di rischio che lo sperimentatore è disposto ad accettare
5. Eseguire gli esperimenti in modo accurato: raccogliere i dati in modo coerente per ridurre al minimo la variabilità e garantire la precisione dei risultati.
6. Modellare i dati: utilizzare metodi statistici per determinare le relazioni tra i fattori e la risposta. Interpretare i risultati e valutare come questi rispondono agli obiettivi e contribuiscono a risolvere il problema.
7. Verificare i risultati previsti con esperimenti di conferma per convalidare il modello.

(22).

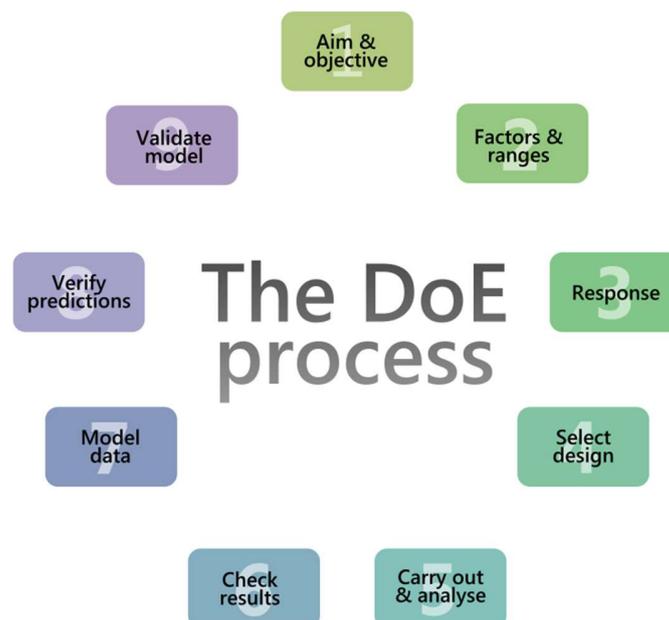


Figura 3. Design of Experiment, gli step operativi per arrivare a validare e confermare un modello di esperimento.

## CAPITOLO 2

### 2.1 Obiettivo della tesi

In questo studio ci siamo proposti di mettere a punto un metodo di raccolta delle urine standardizzato, valutando i processi pre-analitici necessari e utilizzando una metodica automatizzata per l'estrazione dell'mRNA e l'analisi in Real-Time PCR multiplex. L'obiettivo è superare le limitazioni dei test diagnostici attualmente in uso, migliorare le prestazioni dei marcatori urinari e rendere le metodiche facilmente trasferibili alla routine clinica. A tal fine, sono state esaminate le performance di tre biomarcatori del carcinoma della vescica: la citocheratina 7 (CK7), la citocheratina 20 (CK20) e la trascrittasi inversa della telomerasi (TERT).

L'elaborato, quindi, ha l'obiettivo di illustrare l'importanza della fase preanalitica nel nostro studio, con un'attenzione particolare alle variabili che possono causare errori nel processamento dei campioni, utilizzando un approccio DoE per ottenere un campione adeguato per un'analisi accurata, abbiamo lavorato sulla raccolta e sul processamento dei campioni tumorali e di controllo, sviluppando una procedura per creare il campione ideale. Questo ha richiesto una standardizzazione delle metodiche per garantirne la riproducibilità.

### 2.2 Variabili considerate nello studio

È necessario considerare qualsiasi variabile che possa influenzare e condizionare un esperimento. Pertanto, è fondamentale definire chiaramente le condizioni sperimentali e stabilire un modello operativo. Lo studio è stato effettuato su campioni urinari di pazienti con tumore di vescica e soggetti di controllo. Tra le variabili considerate in questo studio vi sono:

- La messa a punto della metodica per l'analisi in Real Time PCR
- Il timing di raccolta
- La matrice urinaria utilizzata, che presenta l'inconveniente di un elevato tasso di contaminazione
- La provenienza del campione.

### *Messa a punto della metodica per l'analisi in Real Time PCR*

Sono state messi a punto i controlli positivi da utilizzare per l'analisi dell'espressione di marcatori. Sono stati analizzati campioni ottenuti riunendo campioni urinari provenienti da pazienti con tumore di vescica di alto grado e campioni ottenuti da una linea cellulare (TCC-SUP) di tumore alla vescica.

### *Timing di raccolta*

In merito ai campioni provenienti da pazienti con tumore di vescica, abbiamo processato sia campioni urinari di prima minzione che campioni di altra minzione. Questo confronto è stato effettuato per determinare se le urine di altra minzione potessero essere utilizzate in alternativa a quelle della prima minzione. Il momento della raccolta è una variabile importante considerata nello studio, poiché nelle prime urine del mattino la concentrazione di elementi cellulari potrebbe essere più alta, il che potrebbe influenzare i risultati dell'analisi.

### *Matrice urinaria*

Il nostro studio si è concentrato sull'analisi dell'espressione dell'mRNA dei tre marcatori. Pertanto, abbiamo valutato come potenziali matrici urinarie il pellet urinario ottenuto per sedimentazione per gravità, le urine intere e il pellet urinario ottenuto per centrifugazione. Questo confronto è stato essenziale per determinare quale matrice potesse fornire i risultati più solidi e significativi per il nostro studio.

### *Provenienza*

Abbiamo preso in considerazione campioni provenienti da due diverse realtà e cioè campioni provenienti dal Centro Prelievi e campioni provenienti dai reparti ospedalieri. Queste provenienze sono considerate variabili importanti poiché i campioni prelevati dai reparti ospedalieri hanno maggior complessità, rispetto a quelli prelevati dal Centro Prelievo, principalmente a causa della presenza di co-morbidità e soprattutto pluripatologie.

## CAPITOLO 3

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 Popolazione di studio

Sono stati considerati 931 campioni urinari, di questi 156 sono campioni di soggetti con tumore vescicale e 775 sono campioni di controllo.

Si tratta di campioni di scarto provenienti dal laboratorio analisi Baldi e Riberi e che arrivano o dai reparti ospedalieri o dal centro prelievi o dalla divisione di urologia del presidio Molinette.

Per la variabile tempo si considerano due popolazioni che comprendono solo pazienti con tumore alla vescica: 69 campioni sono stati ottenuti dalle prime urine del mattino, mentre 50 sono stati prelevati ad orari differenti della giornata. I dati sono riportati in tabella 1.

| TEMPO          | Frequenza | Percentuale |
|----------------|-----------|-------------|
| PRIMA MINZIONE | 69        | 57,98       |
| ALTRA MINZIONE | 50        | 42,02       |

Tabella 1. Numerosità e frequenza per la variabile tempo di raccolta dei campioni.

Gli stessi campioni sono stati suddivisi sulla base della matrice utilizzata per l'analisi: di 450 campioni sono state analizzate le urine intere, di 424 è stato analizzato il pellet, mentre 57 campioni sono stati centrifugati per poi analizzare il pellet (i dettagli sono riportati nel paragrafo preparazione del campione). I campioni tumorali sono stati divisi equamente nella matrice urine intere e nella matrice pellet, mentre nella matrice centrifugato sono presenti 36 campioni tumorali e 21 campioni di controllo. La numerosità e la frequenza dei campioni sono rappresentati in tabella 2.

| <b>MATRICE</b>      | <b>Frequenza</b> | <b>Percentuale</b> |
|---------------------|------------------|--------------------|
| <b>URINE INTERE</b> | 450              | 48,33              |
| <b>PELLET</b>       | 424              | 45,54              |
| <b>CENTRIFUGATO</b> | 57               | 6,13               |

Tabella 2. Numerosità e frequenza delle matrici utilizzate.

Infine, tutti i campioni appartengono a soggetti con età superiore a 50 anni. I campioni di controllo appartenenti al centro prelievi sono 140, mentre 635 campioni di controllo sono provenienti dai reparti ospedalieri. La numerosità e la frequenza dei campioni sono rappresentate dalla tabella 3.

| <b>PROVENIENZA</b>     | <b>Frequenza</b> | <b>Percentuale</b> |
|------------------------|------------------|--------------------|
| <b>CENTRO PRELIEVI</b> | 140              | 18,06              |
| <b>OSPEDALIERI</b>     | 635              | 81,94              |

Tabella 3. Numerosità e frequenza per la variabile provenienza dei campioni.

### 3.2 Estrattore automatico Kairos-96

L' estrazione degli acidi nucleici è stata fatta utilizzando l'estrattore automatico KAIROS 96 (Nurex Srl, Sassari), su cui si possono inserire fino ad un massimo di 96 campioni. Lo strumento è stato progettato per estrarre e purificare gli acidi nucleici garantendo un'elevata purezza. Lo strumento inoltre è in grado di dispensare i campioni estratti e la miscela di reazione per la retroscrittura e l'amplificazione nella piastra da PCR. (Figura 4). Il tempo necessario per l'estrazione di 96 campioni è di circa 120 minuti.



Figura 4 Kairos-96 prodotto dall'azienda Nurex Srl, costituito da un estrattore automatico e da RT-PCR

Nell'alloggiamento di destra esterno al Kairos sono presenti quattro soluzioni: la soluzione A contiene il guanidinio tiocianato che serve per stabilizzare l'RNA, la soluzione B contiene alcol etilico che consente i lavaggi durante la fase di estrazione, la soluzione C contiene metanololo che serve per la purificazione, la soluzione D è un detergente che serve per il lavaggio dello strumento.

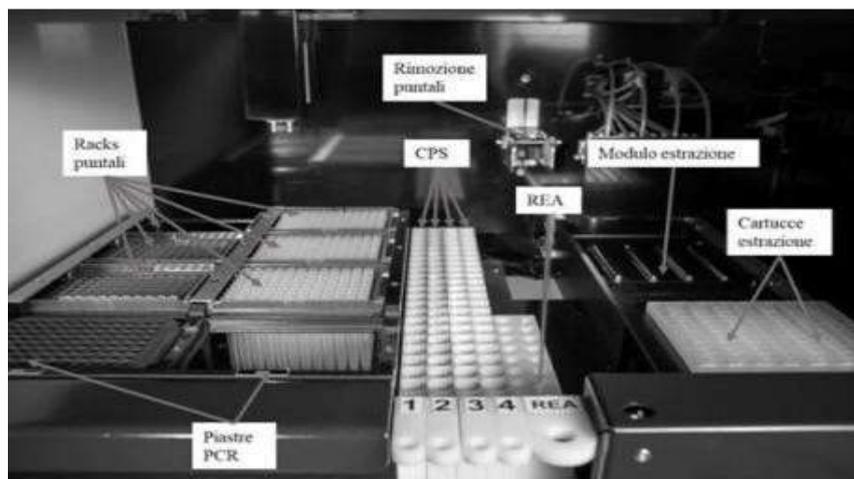


Figura 5. Piano di lavoro di Kairos 96: sulla sinistra sono presenti i rack dei puntali e le piastre PCR, al centro ci sono i rack per i campioni e per i reagenti, a destra sono presenti le cartucce di estrazione.

A sinistra del piano di lavoro si trova un cassetto con sei alloggiamenti per i portapuntali e due per le piastre PCR. Un sensore specifico verifica la corretta posizione dei portapuntali. Per sostituire i rack di puntali, è sufficiente rimuovere il blocco magnetico situato alla destra del rack. Al centro del piano di lavoro sono posizionati quattro rack per i campioni (CPS), come illustrato in Figura 11.

|          |           |      |      |
|----------|-----------|------|------|
| SAMPLE24 | SAMPLE 48 |      |      |
| SAMPLE23 | SAMPLE 47 |      |      |
| SAMPLE22 | SAMPLE 46 |      |      |
| SAMPLE21 | SAMPLE 45 |      |      |
| SAMPLE20 | SAMPLE 44 |      |      |
| SAMPLE19 | SAMPLE 43 |      |      |
| SAMPLE18 | SAMPLE 42 |      |      |
| SAMPLE17 | SAMPLE 41 |      |      |
| SAMPLE16 | SAMPLE 40 |      |      |
| SAMPLE15 | SAMPLE 39 |      |      |
| SAMPLE14 | SAMPLE 38 |      |      |
| SAMPLE13 | SAMPLE 37 |      |      |
| SAMPLE12 | SAMPLE 36 |      |      |
| SAMPLE11 | SAMPLE 35 |      |      |
| SAMPLE10 | SAMPLE 34 |      |      |
| SAMPLE9  | SAMPLE 33 |      |      |
| SAMPLE8  | SAMPLE 32 |      |      |
| SAMPLE7  | SAMPLE 31 |      |      |
| SAMPLE6  | SAMPLE 30 |      |      |
| SAMPLE5  | SAMPLE 29 |      |      |
| SAMPLE4  | SAMPLE 28 |      |      |
| SAMPLE3  | SAMPLE 27 |      |      |
| SAMPLE2  | SAMPLE 26 |      |      |
| SAMPLE1  | SAMPLE 25 |      |      |
| CPS1     | CPS2      | CPS3 | CPS4 |

Tabella 4. Disposizione dei campioni nei rack: si parte dal rack 1 (CPS1) disponendo i campioni in ordine crescente dal basso verso l'alto, si procede nello stesso modo anche per gli altri rack.

A destra dei rack per i campioni si trova un rack per i reagenti (REA) del kit Oncotrack (Nurex srl). Il kit si compone degli elementi indicati in tabella 5.

| Code                        | Description                 | Compatibility | Test number          | Content   | Storage        | Preparation                  |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------|----------------------|---|----------------|------------------------------|
| MS-<br>ONCOTRACK-<br>BC-EXT | Oncotrack-BC-Extraction Kit | Kairos 96     | 960 (96 per session) | (2x) Solution A, B, C, D (in 1000 ml bottles)                   | T. Environment | Ready to use                 |
|                             |                             |               |                      | Elution Solution (20 tubes)<br>Magnetic Beads (20 tubes)        | +4°C           | Shake with vortex before use |
|                             |                             |               |                      | Consumables (extraction cartridges, PCR plates, seals and tips) | T. Environment |                              |

Tabella 5. Estrattore Kairos-96: è costituito da 4 diverse soluzioni: soluzione A, è il guanidinio tiocianato che serve per stabilizzare l'RNA; la soluzione B contiene alcol etilico che consente i lavaggi durante la fase di estrazione, la soluzione C contiene metanolo che serve per la purificazione, la soluzione D è un detergente che serve per il lavaggio del macchinario, oltre a questo sono presenti puntali, piastra PCR, cartucce, resina e soluzione di eluizione.

In questo rack sono inseriti:

- La soluzione di eluizione viene inserita nel primo posto del rack. Questa soluzione viene utilizzata per rompere le interazioni tra l'RNA e le particelle magnetiche senza compromettere la qualità e l'integrità dell'RNA. Solitamente, la soluzione è alcalina e contiene agenti caotropici che aiutano a rompere queste interazioni e a mantenere la stabilità dell'RNA. Inoltre, può includere un agente chelante per rimuovere eventuali ioni metallici. Deve essere conservata nel frigorifero a 4 °C.
- La resina magnetica (0.9 ml quando vengono usati meno di 48 campioni e 1.6 ml quando se ne usano più di 48), contiene particelle in grado di legare gli acidi nucleici. Durante l'estrazione, le particelle possono essere manipolate con una barra magnetica presente all'interno dello strumento, che le attrae e rilascia l'RNA estratto tramite la soluzione di eluizione. Questo processo semplifica la manipolazione durante i passaggi di lavaggio e di eluizione, riducendo il rischio di contaminazione e migliorando la purezza del campione. Prima dell'uso, la resina deve essere agitata con il vortex e poi conservata in frigorifero a 4 °C.

- La miscela di amplificazione si ottiene mescolando la provetta ONCOTRACK BC 2 (470  $\mu$ L), contenente i primer e le sonde per i biomarcatori TERT, CK7 e CK20 nelle concentrazioni indicate in tabella, con ONCOTRACK-1 (335  $\mu$ L), che contiene l'enzima trascrittasi inversa e la DNA polimerasi. La MIX-1 deve essere agitata sul vortex prima di essere inserita nello strumento.

|                |        |
|----------------|--------|
| CK20 for e rev | 200 nM |
| CK20 probe     | 100 nM |
| TERT for e rev | 400 nM |
| TERT probe     | 200 nM |
| CK7 for e rev  | 60 nM  |
| CK7 probe      | 32 nM  |

Tabella 6. Concentrazioni dei primers e delle sonde dei tre marcatori.

A destra del piano di lavoro si trova il modulo di estrazione, dove sono collocate le cartucce di estrazione, come si può notare dall'immagine. I vari campioni saranno dispensati nei diversi pozzetti delle cartucce seguendo una sequenza ben precisa, come indicato nella tabella 7.

|                               |          |          |          |  |                             |          |          |          |
|-------------------------------|----------|----------|----------|--|-----------------------------|----------|----------|----------|
| SAMPLE23                      | SAMPLE47 | SAMPLE23 | SAMPLE47 |  | SAMPLE24                    | SAMPLE48 | SAMPLE24 | SAMPLE48 |
| SAMPLE21                      | SAMPLE45 | SAMPLE21 | SAMPLE45 |  | SAMPLE22                    | SAMPLE46 | SAMPLE22 | SAMPLE46 |
| SAMPLE19                      | SAMPLE43 | SAMPLE19 | SAMPLE43 |  | SAMPLE20                    | SAMPLE44 | SAMPLE20 | SAMPLE44 |
| SAMPLE17                      | SAMPLE41 | SAMPLE17 | SAMPLE41 |  | SAMPLE18                    | SAMPLE42 | SAMPLE18 | SAMPLE42 |
| SAMPLE15                      | SAMPLE39 | SAMPLE15 | SAMPLE39 |  | SAMPLE16                    | SAMPLE40 | SAMPLE16 | SAMPLE40 |
| SAMPLE13                      | SAMPLE37 | SAMPLE13 | SAMPLE37 |  | SAMPLE14                    | SAMPLE38 | SAMPLE14 | SAMPLE38 |
| SAMPLE11                      | SAMPLE35 | SAMPLE11 | SAMPLE35 |  | SAMPLE12                    | SAMPLE36 | SAMPLE12 | SAMPLE36 |
| SAMPLE9                       | SAMPLE33 | SAMPLE9  | SAMPLE33 |  | SAMPLE10                    | SAMPLE34 | SAMPLE10 | SAMPLE34 |
| SAMPLE7                       | SAMPLE31 | SAMPLE7  | SAMPLE31 |  | SAMPLE8                     | SAMPLE32 | SAMPLE8  | SAMPLE32 |
| SAMPLE5                       | SAMPLE29 | SAMPLE5  | SAMPLE29 |  | SAMPLE6                     | SAMPLE30 | SAMPLE6  | SAMPLE30 |
| SAMPLE3                       | SAMPLE27 | SAMPLE3  | SAMPLE27 |  | SAMPLE4                     | SAMPLE28 | SAMPLE4  | SAMPLE28 |
| SAMPLE1                       | SAMPLE25 | SAMPLE1  | SAMPLE25 |  | SAMPLE2                     | SAMPLE26 | SAMPLE2  | SAMPLE26 |
| CARTUCCIA ESTRAZIONE SINISTRA |          |          |          |  | CARTUCCIA ESTRAZIONE DESTRA |          |          |          |

Tabella 7. Dispensazione campioni nelle cartucce di estrazione: ciascun campione viene dispensato nei pozzetti delle varie cartucce seguendo questo schema , insieme alla soluzione di eluizione e alla resina magnetica.

Lo strumento inizialmente dispensa la resina in tutti i pozzetti della cartuccia di estrazione. Successivamente, i campioni vengono dispensati nei pozzetti. La resina si lega selettivamente agli acidi nucleici. Successivamente, una barra magnetica attrae la resina magnetica insieme agli acidi nucleici, permettendo la rimozione delle altre componenti del campione. Dopodiché, viene aggiunta la soluzione di eluizione per liberare gli acidi nucleici dalla resina. A questo punto, i campioni sono dispensati nella piastra da PCR (dove precedentemente è stata dispensata la mix) seguendo la disposizione indicata nella tabella 8.

| PCR |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|     | 1       | 2       | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10       | 11       | 12       |
| A   | SAMPLE1 | SAMPLE5 | SAMPLE25 | SAMPLE29 | SAMPLE9  | SAMPLE13 | SAMPLE33 | SAMPLE37 | SAMPLE17 | SAMPLE21 | SAMPLE41 | SAMPLE45 |
| B   | SAMPLE1 | SAMPLE5 | SAMPLE25 | SAMPLE29 | SAMPLE9  | SAMPLE13 | SAMPLE33 | SAMPLE37 | SAMPLE17 | SAMPLE21 | SAMPLE41 | SAMPLE45 |
| C   | SAMPLE2 | SAMPLE6 | SAMPLE26 | SAMPLE30 | SAMPLE10 | SAMPLE14 | SAMPLE34 | SAMPLE38 | SAMPLE18 | SAMPLE22 | SAMPLE42 | SAMPLE46 |
| D   | SAMPLE2 | SAMPLE6 | SAMPLE26 | SAMPLE30 | SAMPLE10 | SAMPLE14 | SAMPLE34 | SAMPLE38 | SAMPLE18 | SAMPLE22 | SAMPLE42 | SAMPLE46 |
| E   | SAMPLE3 | SAMPLE7 | SAMPLE27 | SAMPLE31 | SAMPLE11 | SAMPLE15 | SAMPLE35 | SAMPLE39 | SAMPLE19 | SAMPLE23 | SAMPLE43 | SAMPLE47 |
| F   | SAMPLE3 | SAMPLE7 | SAMPLE27 | SAMPLE31 | SAMPLE11 | SAMPLE15 | SAMPLE35 | SAMPLE39 | SAMPLE19 | SAMPLE23 | SAMPLE43 | SAMPLE47 |
| G   | SAMPLE4 | SAMPLE8 | SAMPLE28 | SAMPLE32 | SAMPLE12 | SAMPLE16 | SAMPLE36 | SAMPLE40 | SAMPLE20 | SAMPLE24 | SAMPLE44 | SAMPLE48 |
| H   | SAMPLE4 | SAMPLE8 | SAMPLE28 | SAMPLE32 | SAMPLE12 | SAMPLE16 | SAMPLE36 | SAMPLE40 | SAMPLE20 | SAMPLE24 | SAMPLE44 | SAMPLE48 |

Tabella 8. Disposizione campioni nella piastra PCR: dopo la fase di estrazione, i vari campioni sono disposti nei vari pozzetti della piastra PCR.

### 3.3 RT-PCR Real Time

Lo studio sui biomarcatori è stato fatto in RT-PCR multiplex, importante per lo studio dell'espressione genica, utilizzando lo strumento CFX di Bio-Rad in linea con Kairos 96. La RT-PCR (la reazione a catena della polimerasi) si tratta di una replicazione in vitro mediante una DNA polimerasi, due oligonucleotidi lunghi 20-30 nt che fungono da primer, i dNTPs (deossinucleoside trifosfati) e ioni magnesio nel tampone. La reazione avviene tramite tre passaggi (figura 6):

1. Denaturazione: 30 sec a 95°C.
2. Annealing: 30 sec a 40-60°C per favorire l'associazione specifica degli inneschi
3. Estensione: 2 min a 72°C, temperatura ottimale per la polimerasi che estende i primer incorporando i dNTPs.

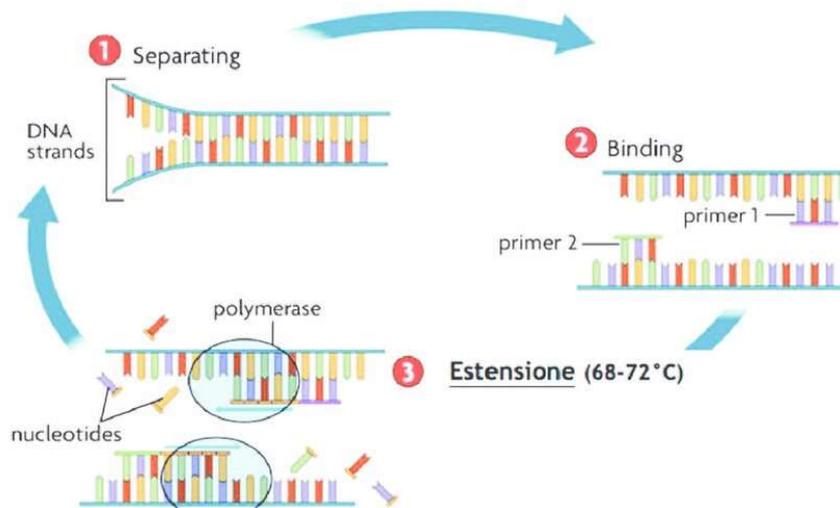


Figura 6. Fasi della PCR: 1 - denaturazione della doppia elica, 2 - annealing per associazione dei primers, 3 - sintesi da parte della polimerasi.

Nella RT-PCR, dopo l'estrazione, l'RNA viene convertito in DNA complementare (cDNA) tramite l'enzima trascrittasi inversa, successivamente, il cDNA viene denaturato e durante la fase di annealing vengono aggiunti i primers e le sonde specifiche per ciascun marcatore. Questi primers e sonde si legano alle regioni di interesse del DNA. Successivamente, la DNA polimerasi allunga il filamento, formando una nuova catena di DNA complementare alla sequenza bersaglio.

La Real Time-PCR consente di monitorare l'incremento della quantità di prodotto durante ogni ciclo di amplificazione in tempo reale, permettendo l'identificazione della fase esponenziale attraverso sistemi di sensing; questi sistemi utilizzano fluorofori legati alle sonde specifiche per i diversi marcatori.

L'aumento progressivo delle molecole amplificate genera un segnale di fluorescenza, che viene monitorato in tempo reale e offre elevata sensibilità e specificità, eliminando la necessità di analisi post-amplificazione.

Durante la PCR, i campioni vengono esposti a una fonte luminosa per eccitare i fluorofori, una volta eccitati, i fluorofori emettono un segnale fluorescente che è rilevato tramite un detector. Nel nostro studio, sono stati utilizzati tre tipi di fluorofori per identificare i biomarcatori tumorali, come illustrato nella tabella 9.

| Fluorofori | Target |
|------------|--------|
| FAM        | CK20   |
| HEX        | TERT   |
| Cy5        | CK7    |

Tabella 9. Fluorofori utilizzati nella RT-PCR: FAM è 6-carbossifluorescina il cui target è CK20, HEX è l'esaclorofluorescina, il cui target è TERT, Cy5 è Invitrogen cianina 5, il cui target è CK7.

- I. FAM (6-carbossifluorescina), è il colorante fluorescente più comunemente utilizzato per le sonde durante la reazione di PCR, è molto reattivo e ha un massimo di 492 nm di assorbimento e un massimo di emissione di 571 nm.
- II. HEX (Esaclorofluorescina), presenta un massimo assorbimento di 535 nm e un massimo di emissione di 556 nm.
- III. Cy5 (Invitrogen cianina 5), è un colorante rosso-fluorescente con massimo di assorbimento di 647 nm e massima emissione intorno a 665 nm.

Il picco massimo di fluorescenza si verifica durante la fase di estensione, cioè quando la molecola coniugata al fluoroforo si intercala nei frammenti amplificati.

Durante la fase di denaturazione il segnale fluorescente diminuisce rapidamente poiché la sonda con il fluoroforo è rilasciata in soluzione a causa della dissociazione dei filamenti di DNA a seguito dell'aumento della temperatura. La quantità di prodotto amplificato si misura attraverso l'emissione del segnale dei fluorofori, alla fine di ciascun ciclo di amplificazione.

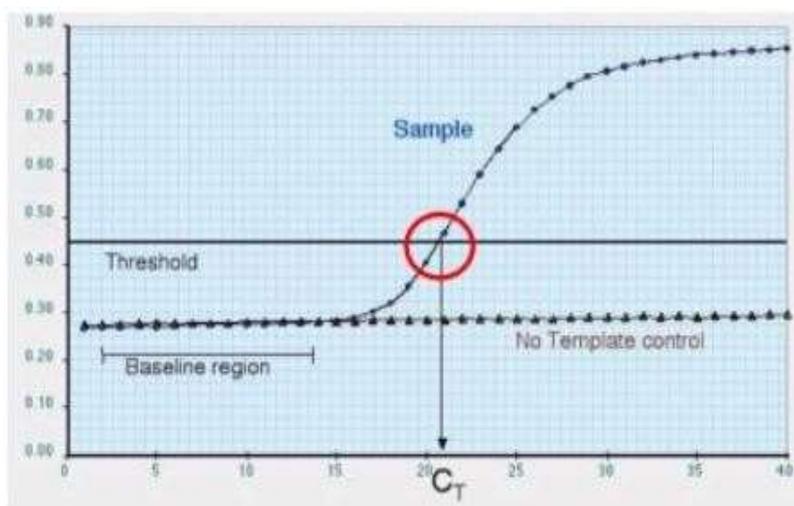


Figura 7. Esempio curva di amplificazione: curva sigmoide che serve per identificare il ciclo di amplificazione, in cui si è accumulata una quantità tale da generare un segnale fluorescente.

Come si osserva dalla figura 7, la curva di amplificazione è di forma sigmoide: nei primi cicli, la fluorescenza non è rilevata, successivamente cresce esponenzialmente, entrando poi in una fase lineare prima di raggiungere il plateau. Nella valutazione della Curva di Amplificazione, vengono presi in considerazione tre parametri: la baseline (regione iniziale), la linea soglia e il ciclo soglia, indicati rispettivamente come "Baseline region", "Threshold" e "CT". La baseline rappresenta il livello del segnale durante i primi cicli, quando il segnale fluorescente è relativamente basso e può essere considerato simile al rumore di fondo.

La linea di soglia presa in considerazione varia nei tre marcatori:

- Per CK7 viene considerata una soglia pari a 70
- Per CK20 pari a 100
- Per TERT pari a 30

Un valore CT più basso corrisponde a una maggiore quantità di campione iniziale.

### 3.4 Preparazione dei campioni

#### *Controllo positivo*

Il controllo positivo è stato preparato solubilizzando 1:1 in guanidinio tiocianato 4M quattro differenti miscele di campioni urinari provenienti da pazienti con tumore di vescica di alto grado oppure solubilizzando 10.000 cellule di TCC-SUP, una linea immortalizzata di tumore di vescica in 1 ml di guanidinio 4M; questi controlli sono stati conservati a -2°C e sono stati vortexati prima dell'utilizzo.

#### *Campioni*

Per la preparazione dei campioni analizzati, sono stati utilizzati diversi protocolli per ciascuna delle matrici considerate, prima di effettuare l'estrazione e l'analisi.

I campioni tumorali sono stati processati con protocolli alternativi:

- Per la raccolta della matrice urinaria "urine intere", veniva ritirato il campione dal paziente, successivamente si agitava il campione prima di prelevarne 1 ml, che veniva poi inserito in provette contenenti 1 ml di guanidinio e vortexato per 10 secondi.
- Per la raccolta della matrice pellet, il campione urinario del paziente era lasciato sedimentare per 30 minuti, successivamente veniva rimosso il surnatante lasciando 1 ml di pellet sul fondo della provetta che veniva trasferito in provette contenenti 1 ml di guanidinio e vortexato per 10 secondi.
- Per la raccolta della matrice centrifugata, le provette venivano centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti a 4°C, successivamente, veniva rimosso il surnatante e 1 ml di pellet era trasferito in provette contenenti 1 ml di guanidinio, e vortexato per 10 secondi.

In alcuni campioni tumorali è stato possibile effettuare l'analisi su due matrici.

Anche nel caso dei campioni di controllo, sono stati utilizzati in alternativa i tre protocolli descritti utilizzando i campioni residui dall'analisi del sedimento urinario. Per i campioni di controllo è stato possibile effettuare l'analisi di un solo tipo di matrice per ogni campione a causa della scarsa quantità di urina a disposizione.

### 3.5 Analisi Statistica

Le variabili sono state espresse con le sintesi statistiche più appropriate.

In particolare, le variabili continue con i valori di media e deviazione standard , le variabili categoriche esibendo la numerosità e la frequenza relativa sia nel campione complessivo che stratificato per le opportune variabili di interesse, quali matrice, tempo, provenienza e confronto tra le mix.

Le variabili continue (CK7 e CK20) sono state valutate con test di Kolmogorov-Smirnov, per verificare il tipo di distribuzione e utilizzare nei confronti a due o più gruppi i test corretti di T-test di student (parametrico) o non parametrico Wilcoxon e Kruskal-Wallis in maniera appropriata. Per provenienza, matrice, tempo e la messa a punto del controllo positivo sono stati utilizzati i test di Wilcoxon e Kruskal-Wallis nel confronto dei biomarcatori.

Per i test delle variabili categoriche (TERT), sono stati utilizzati i test dei Chi-quadro e laddove le tabelle di contingenza presentavano una frequenza inferiore al 5% nelle celle interne, è stato utilizzato il metodo esatto con il test di Fisher.

Il software statistico utilizzato è SAS versione 9.4 per Windows.

## CAPITOLO 4

### RISULTATI

La popolazione osservata presenta i biomarcatori tumorali CK7 e CK20, considerati come variabili continue. Per questi biomarcatori sono stati calcolati la media, la deviazione standard, gli intervalli interquartili e la mediana, basandosi sui cicli soglia. TERT, essendo una variabile categorica, è stata valutata in base a frequenza e percentuale di espressione del biomarcatore nei campioni, rispetto alle variabili continue CK7 e CK20. Un campione è stato considerato positivo quando il valore soglia di TERT era inferiore a 40.

Si deve tenere in considerazione che i valori ottenuti dalla PCR sono espressi in cicli soglia e di conseguenza un valore inferiore, indica una maggiore espressione; al contrario, quando il valore risulta essere maggiore, il marcatore risulta meno espresso.

All'inizio dello studio abbiamo valutato l'espressione dei tre marcatori su due differenti controlli positivi al fine di ottimizzare la metodica di analisi. Abbiamo utilizzato quattro differenti miscele di campioni urinari, caratterizzati da un alto grado di tumore della vescica e un controllo costituito da cellule di una linea di tumore vescicale.

Dalle figure 8, 9 e 10 è evidente come l'espressione di CK7,CK20 e TERT sia molto alta nelle prime due mix di urine e decisamente più bassa nelle seconde due mix.

Infatti nella MIX 1 abbiamo trovato valori medi di CK7 pari a 32,11, CK20 a 20,63 e TERT a circa 28; nella MIX2 CK7 ha un valore di 18,24, CK20 di 16 e TERT di 23,78; nella MIX 3, si hanno valori medi di 33,72 per CK7, 34,12 per CK20 e 38,97 per TERT; Nella MIX 4, i valori medi dei tre marcatori si assestavano a circa 45,0 indicando la completa perdita di segnale.

Nel controllo positivo ottenuto da una linea cellulare di tumore della vescica (MIX 5). Abbiamo osservato valori medi di CK7 pari a 33,65, CK20 a 31,13 e TERT a 30,78.

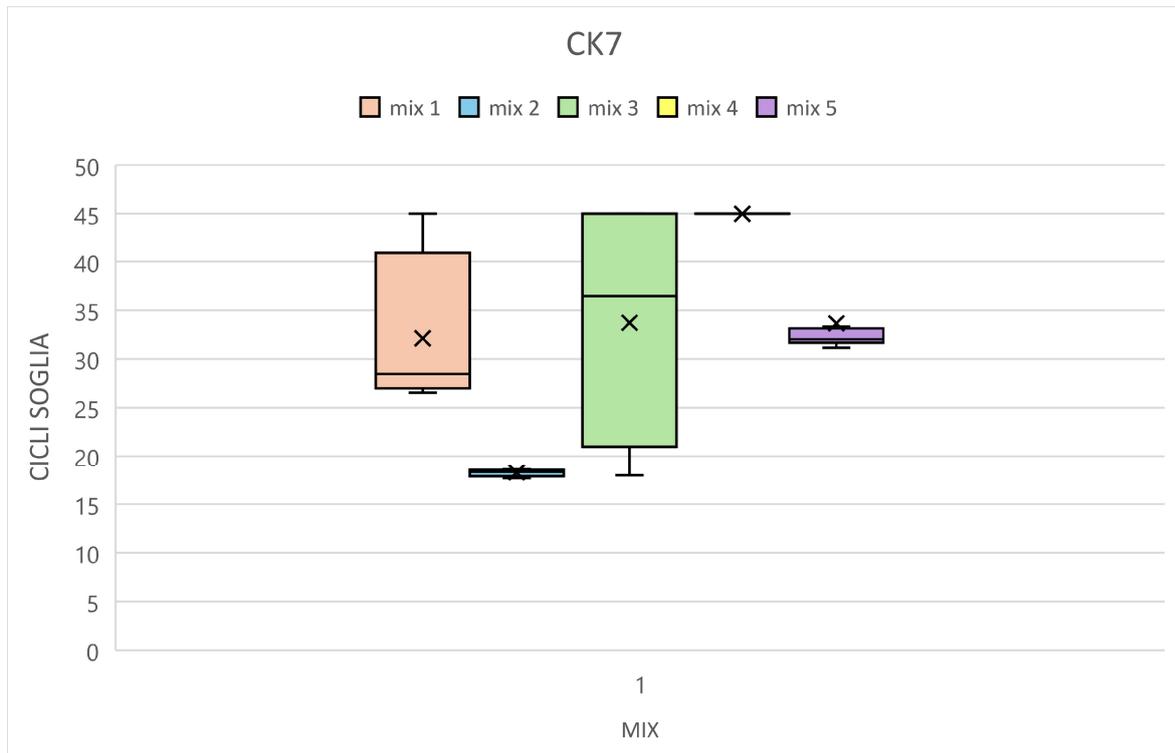


Figura 8. Box plot per la miscela specifica utilizzata per l'analisi dei campioni sul biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa), si osserva come nella MIX 1, il CK7 abbia un valore medio pari a  $32,11 \pm DS 8,642135$  (quartile inferiore 27,9 – quartile superiore 45,0 – mediana 28,45). Nel secondo box plot, (azzurro), si osserva un valore medio di  $18,24 \pm DS 0,347235$  di CK7 per la MIX 2 (quartile inferiore 17,96 – quartile superiore 18,62 – mediana 18,34). Nel terzo box plot (verde), è riportato CK7 espresso nella MIX 3, con un valore medio pari a  $33,72 \pm DS 8,035435$  (quartile inferiore 21,40 – quartile superiore 45,0 – mediana 36,45). Nel quarto box plot, relativo a CK7 espresso nella MIX 4, si nota la scomparsa del controllo completamente, si osserva un valore medio di  $45,0 \pm DS 0$  (quartile inferiore 45,0 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). Nell'ultimo box plot (viola), è riportato CK7 espresso nella MIX 5, con un valore medio pari a  $33,65 \pm DS 7,15211$  (quartile inferiore 31,67 – quartile superiore 45,0 – mediana 31,99), si osserva infatti una risalita dei valori. P-value = 0,0002 (test Kruskal-Wallis).

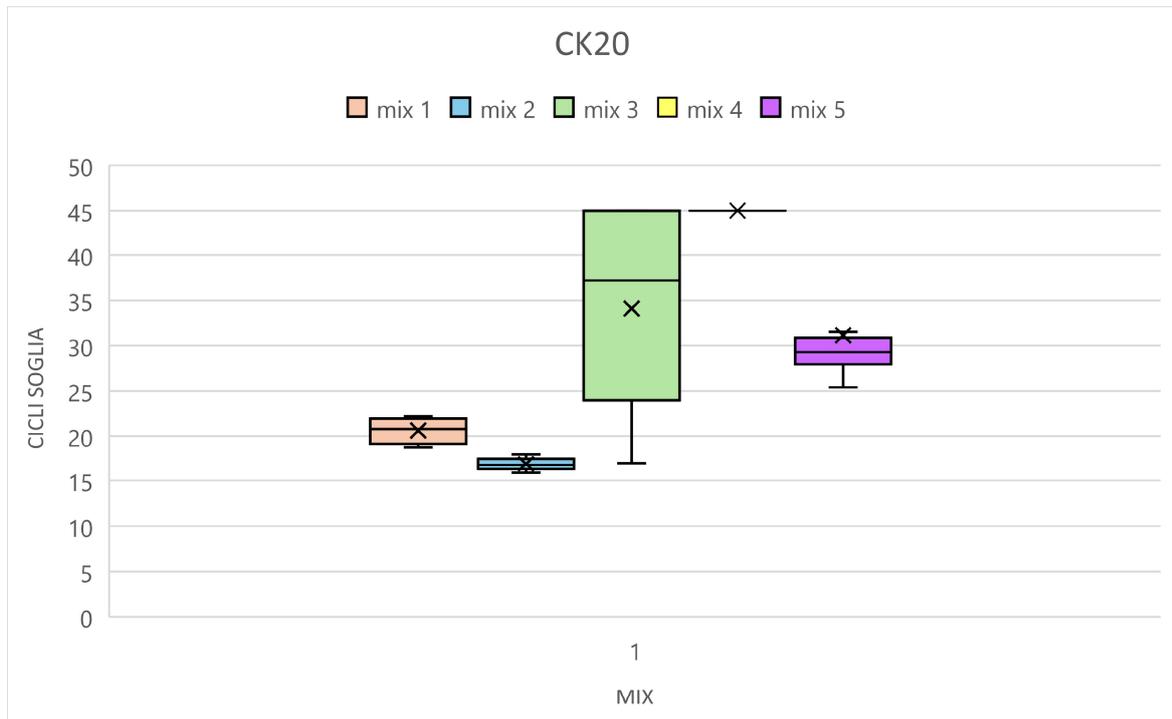


Figura 9. Box plot per la miscela specifica utilizzata per l'analisi dei campioni sul biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa), si osserva come nella MIX 1, il biomarcatore CK20 abbia un valore medio pari a  $20,63 \pm DS 11,4518$  (quartile inferiore 19,94 – quartile superiore 22,21 – mediana 20,78). Nel secondo box plot, (azzurro), si osserva un valore medio di  $16,9 \pm DS 0,67778$  di CK20 per la MIX 2 (quartile inferiore 16,47 – quartile superiore 18,0 – mediana 16,81). Nel terzo box plot (verde), è riportato CK20 espresso nella MIX 3, con un valore medio pari a  $34,12 \pm DS 11,4216$  (quartile inferiore 24,67– quartile superiore 45,0 – mediana 37,19). Nel quarto box plot, relativo a CK20 espresso nella MIX 4, anche in questo caso, si nota la scomparsa del controllo, si osserva un valore medio di  $45,0 \pm DS 0$  (quartile inferiore 45,0 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). Nell'ultimo box plot (viola), è riportato CK20 espresso nella MIX 5, con un valore medio pari a  $31,13 \pm DS 6,09303$  (quartile inferiore 28,22 – quartile superiore 45,0 – mediana 29,29), si osserva una risalita dei valori. P-value < 0,0001 (test di Kruskal-Wallis).

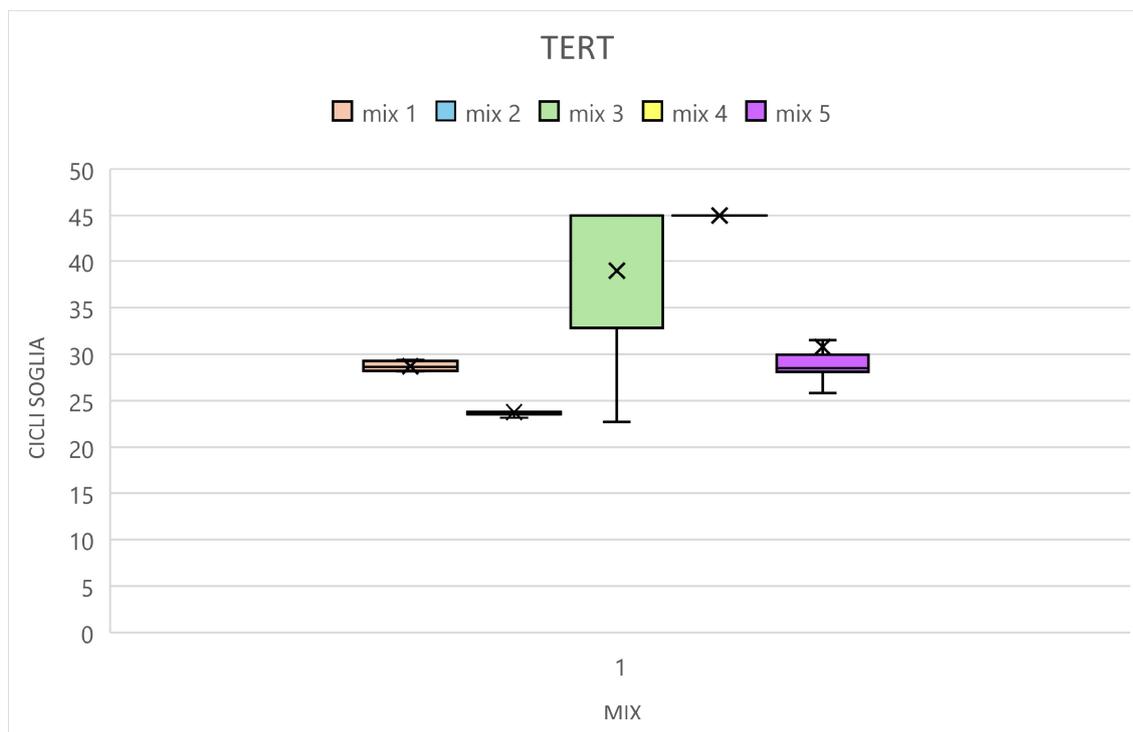


Figura 10. Box plot per la miscela specifica utilizzata per l'analisi dei campioni sul biomarcatore TERT. Nel primo box plot (rosa), si osserva come nella MIX 1, TERT abbia un valore medio pari a  $28,69 \pm DS 0,56494$  (quartile inferiore 28,28 – quartile superiore 29,38 – mediana 28,62). Nel secondo box plot, (azzurro), si osserva un valore medio di  $23,78 \pm DS 0,50899$  di TERT per la MIX 2 (quartile inferiore 23,5 – quartile superiore 24,84 – mediana 23,7). Nel terzo box plot (verde), è riportato TERT espresso nella MIX 3, con un valore medio pari a  $38,97 \pm DS 8,66005$  (quartile inferiore 33,18 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). Nel quarto box plot, relativo a TERT espresso nella MIX 4, anche in questo caso, si nota la scomparsa del controllo, si osserva un valore medio di  $45,0 \pm DS 0$  (quartile inferiore 45,0 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). Nell'ultimo box plot (viola), è riportato TERT espresso nella MIX 5, con un valore medio pari a  $30,78 \pm DS 6,17021$  (quartile inferiore 28,19 – quartile superiore 45,0 – mediana 28,5); nella MIX 5 si nota una risalita dei valori. P-value < 0,0001 (test di Kruskal-Wallis).

L'altra variabile presa in considerazione in merito all'analisi sui campioni è stata il timing della raccolta: l'indagine è stata condotta sui campioni di pazienti con tumore alla vescica. I campioni sono stati prelevati dai pazienti ricoverati nel reparto di urologia ed è stato valutato se ci fosse una differenza significativa nell'espressione dei marcatori tra le prime urine del mattino e quelle

raccolte durante altre minzioni nel corso della giornata. I campioni di prima minzione sono 69 e il valore di CK7 espresso in cicli soglia risulta essere circa 35, mentre nel caso di altra minzione, i cui campioni sono 50, si ottiene un valore pari a 38; questo indica che CK7 risulta essere maggiormente espresso nei campioni urinari delle prime urine del mattino, per quanto riguarda invece CK20, si è osservato un valore pari a 38 nelle prime urine del mattino e un valori di circa 36 per altra minzione, per cui il marcatore risulta maggiormente espresso nell'altra minzione. I dati sono riportati nelle figure 11 e 12.

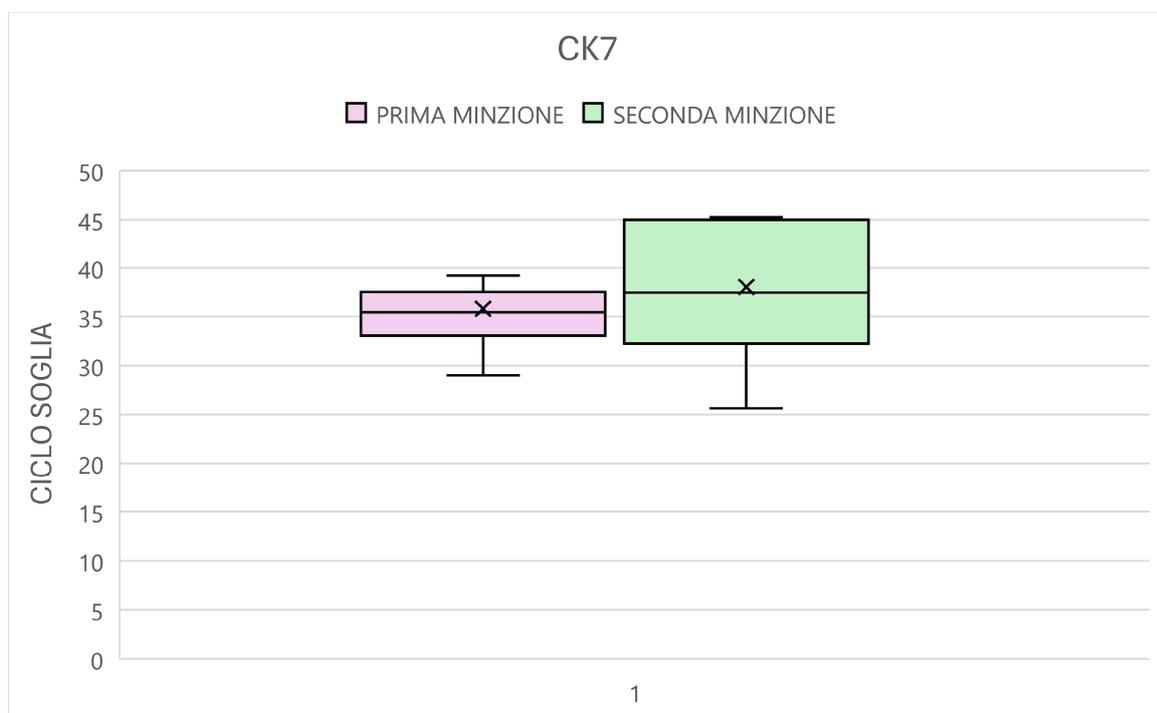


Figura 11. Box plot della prima variabile timing di raccolta per il biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa), che indica CK7 rilevato nei campioni delle prime urine del mattino (n=69), è stato osservato un valore medio pari a  $35,79 \pm DS 4.4696387$  (Quartile inferiore 33,09 – quartile superiore 37,45 - mediana 35,47). Il secondo box plot (verde) indica CK7 rilevato in campioni di altra minzione (n=50), ed è stato osservato un valore medio pari a  $38,02 \pm DS 5.9678308$  (quartile inferiore 32,27 – quartile superiore 45 – mediana 37,45). P-value < 0,0342 (Test di Wilcoxon).

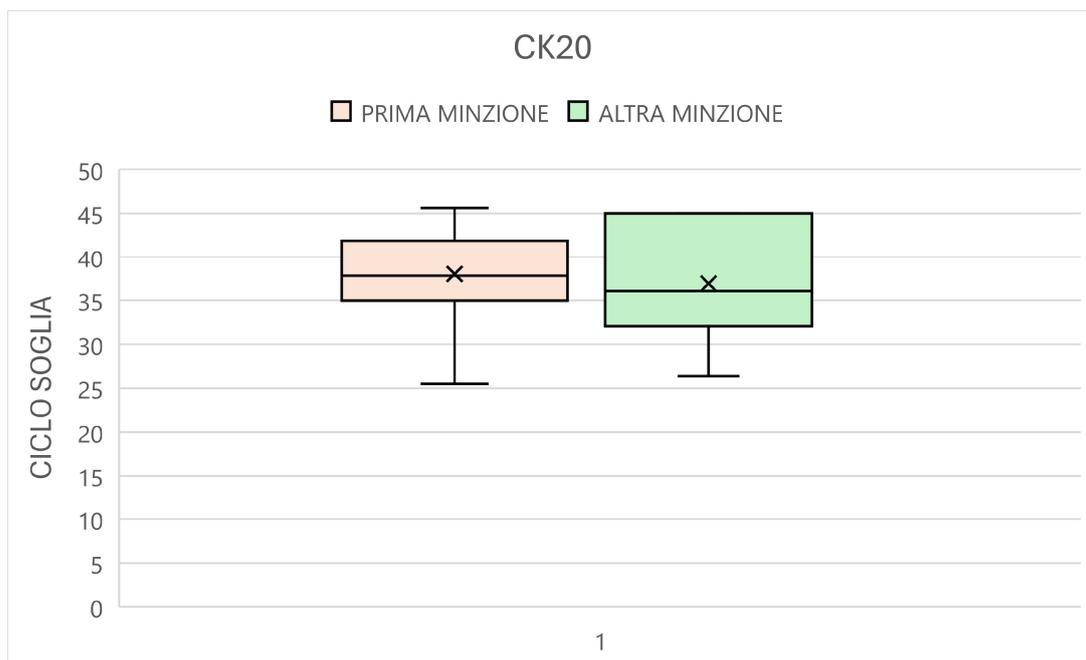


Figura 12. Box plot della variabile timing di raccolta per il biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa), che indica CK20 rilevato nei campioni delle prime urine del mattino (n=69), è stato osservato un valore medio pari a  $38,01 \pm DS 4,7701615$  (quartile inferiore 35 – quartile superiore 40,77 - mediana 37,79). Il secondo box plot (verde) relativo a CK20 in campioni di altra minzione (n=50), ha rilevato un valore medio pari a  $36,86 \pm DS 5,9682809$  (quartile inferiore 32,05 – quartile superiore 45 – mediana 35,97). P-value 0,1504 (Test di Wilcoxon).

È stata valutata anche l'espressione di TERT nei campioni tumorali di prima minzione e altra minzione. In merito alla prima minzione, 12 campioni su 69 esprimono TERT con una percentuale del 17,39% ; i restanti 57 non esprimono il marcatore. Per l'altra minzione, 11 su 50 campioni esprimono TERT, quindi il 22%, mentre i restanti 39 non lo esprimono. I dati sono rappresentati in Tabella 10.

| <b>TERT</b>   | <b>PRIMA<br/>MINZIONE</b> | <b>ALTRA<br/>MINZIONE</b> |
|---------------|---------------------------|---------------------------|
| NO            | 57                        | 39                        |
| SI            | 12                        | 11                        |
| <b>TOTALE</b> | <b>69</b>                 | <b>50</b>                 |

Tabella 10. valutazione del biomarcatore TERT su campioni di prima minzione e altra minzione. Nella prima minzione 12 su 69 esprimono TERT di conseguenza si ha una percentuale del 17,39%; nell'altra minzione 11 su 50 esprimono il biomarcatore per cui si ha una percentuale di positività del 22%. P-value 0,5297 (test del Chi-Quadro).

La seconda variabile valutata è stata la matrice migliore da utilizzare per la ricerca dell'espressione dei marcatori. Sono state valutate tre diverse matrici: le urine intere, il pellet e il centrifugato. È stata quindi comparata la differenza di marcatori nelle diverse matrici tra i campioni tumorali e i campioni di controllo.

La prima matrice considerata è "urine intere"; i valori dei cicli soglia relativi a CK7 risultano essere inferiori nei pazienti con il tumore della vescica, rispetto ai controlli, (rispettivamente 38 e 42), di conseguenza il biomarcatore sarà più espresso nei campioni tumorali rispetto ai controlli. Anche CK20 appare più espresso nei campioni di tumore con valore di 36 rispetto al valore di 44 osservato nei controlli. I dati sono riportati nelle figure 13 e 14.

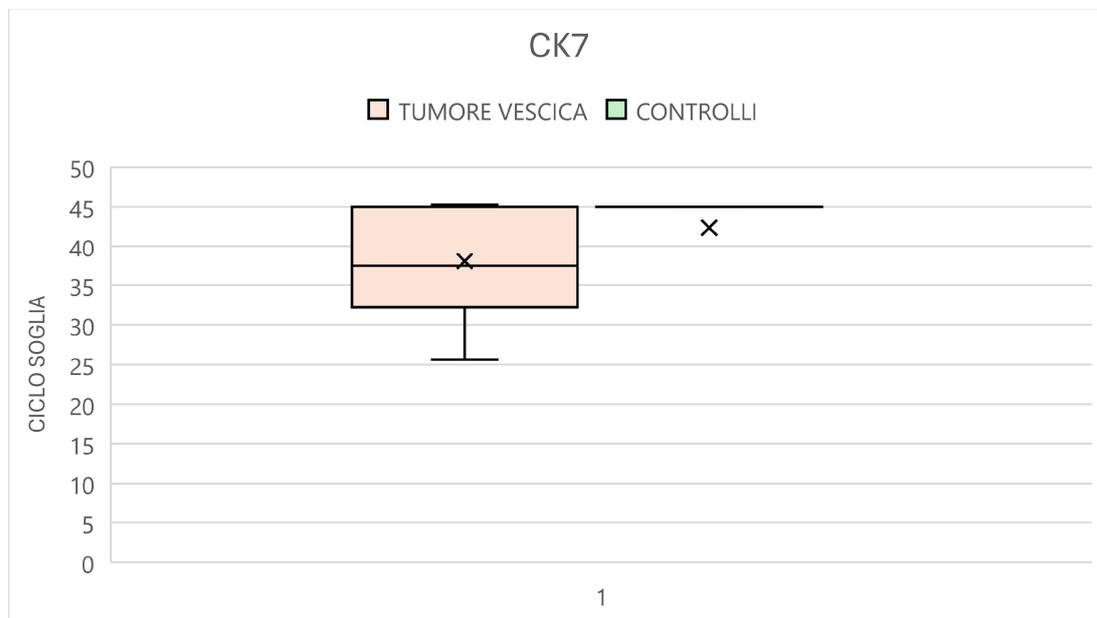


Figura 13. Box plot della variabile matrice urine intere per il biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK7 espresso nelle urine intere dei campioni tumorali (n=50), è stato osservato un valore medio di  $38,0 \pm DS 5,9678308$  (quartile inferiore 32,27 – quartile superiore 45 – mediana 37,45). Il secondo box plot relativo all'espressione di CK7 nei controlli (n=400), ha rilevato un valore medio di  $42,36 \pm DS 5,465283$  (quartile inferiore 45,0 - quartile superiore 45,0 - mediana 45,0). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

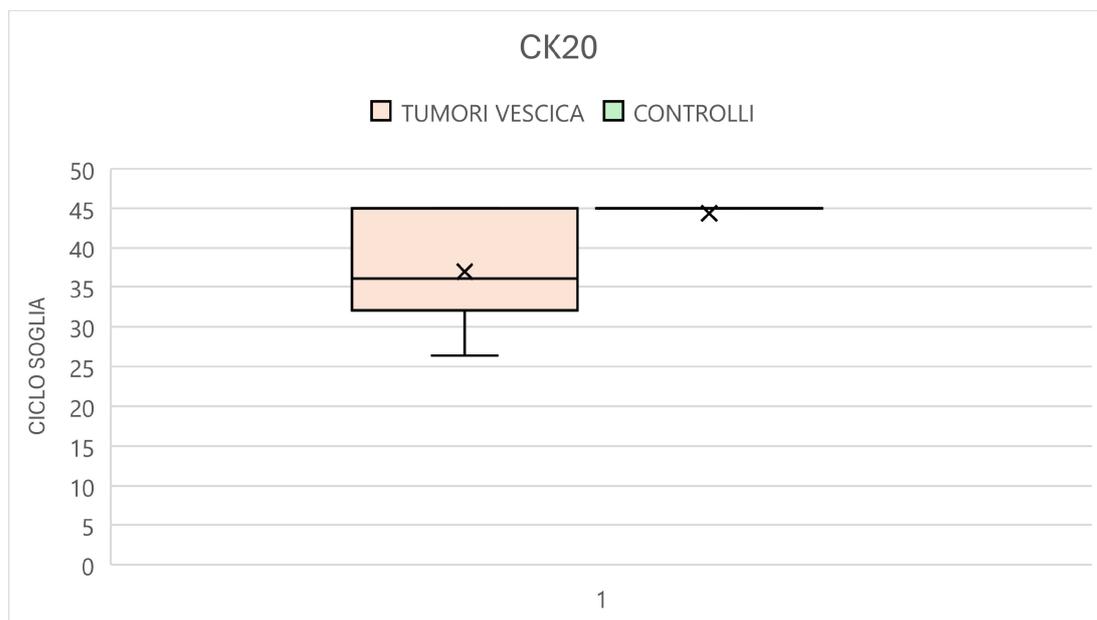


Figura 14. Box plot della variabile matrice urine intere per il biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK20 espresso nelle urine intere dei campioni tumorali (n=50), è stato osservato un valore medio pari a  $36,85 \pm DS 5,9682809$  (quartile inferiore 32,05 – quartile superiore 45,0 – mediana 35,97). Nel secondo box plot è riportata l'espressione di CK20 nei controlli (n=400) che ha rilevato un valore medio di  $44,51 \pm DS 2,3182325$  (quartile inferiore 45,0 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

La seconda matrice considerata è stata il pellet. I valori dei biomarcatori si osservano inferiori nel caso di CK7 nei campioni tumorali dove si ha un valore medio di 35,79 rispetto ai controlli che ha un valore di 38,64. Per CK20 sia nei tumori che nei controlli il valore medio dei cicli soglia è di circa 38, infatti per CK20 la differenza non è statisticamente significativa. I dati sono rappresentati dalle figure 15 e 16.

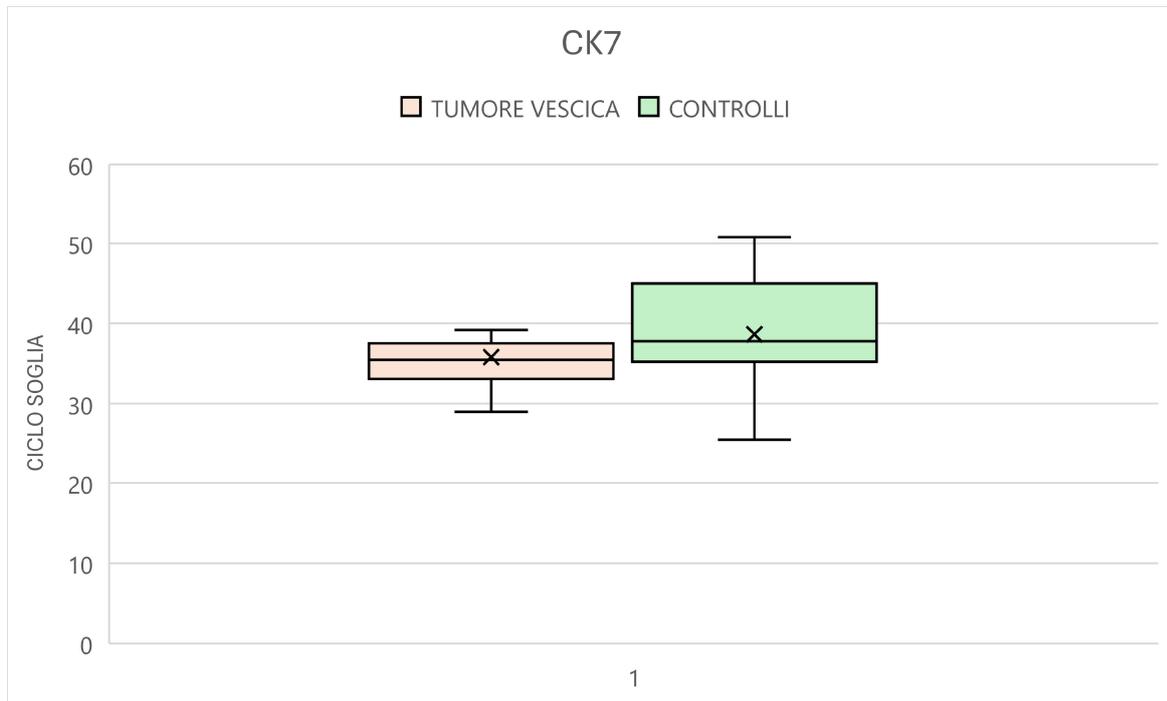


Figura 15. Box plot della variabile matrice pellet per il biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK7 espresso nel pellet dei campioni tumorali (n=69), è stato osservato un valore medio pari a  $35,79 \pm DS 4,4696387$  (quartile inferiore 33,09 – quartile superiore 37,45 – mediana 35,47). Nel secondo box plot (verde) è riportata l'espressione di CK7 nei controlli (n=355) che ha rilevato un valore medio di  $38,64 \pm DS 4,623748$  (quartile inferiore 35,21 – quartile superiore 45,0 – mediana 37,79). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

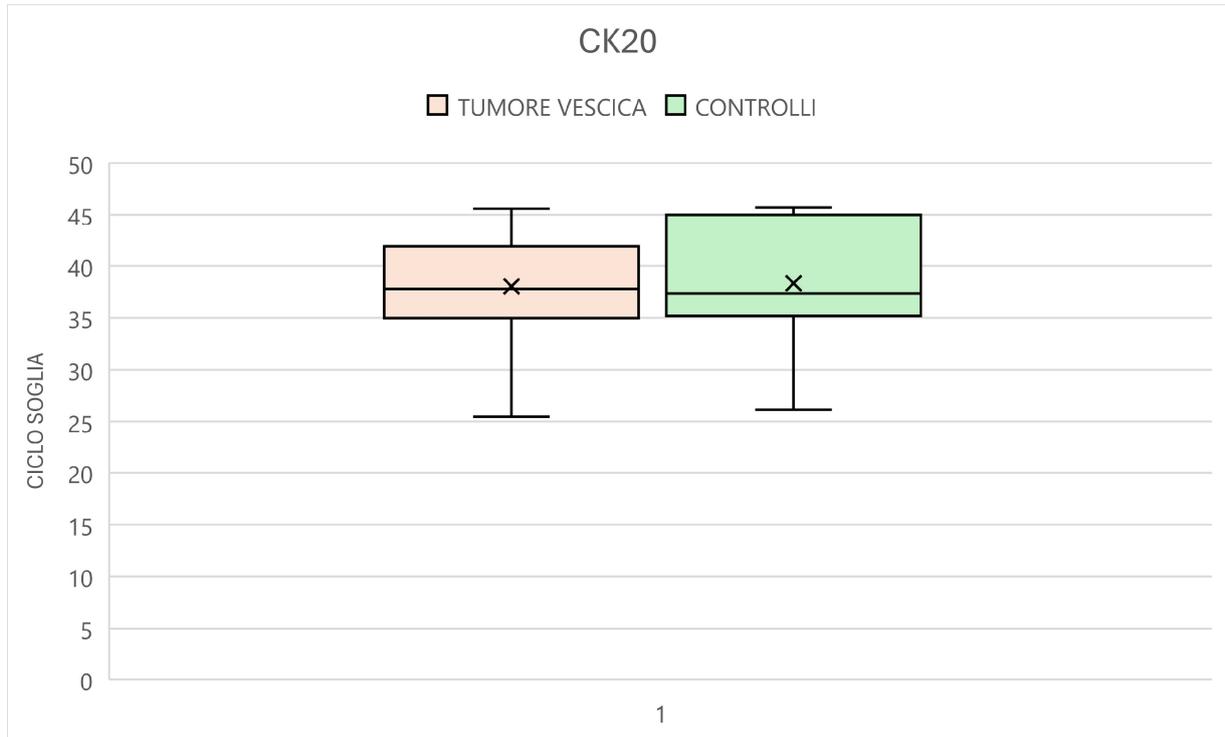


Figura 16. Box plot della variabile matrice pellet per il biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK20 espresso nel pellet dei campioni tumorali (n=69), è stato osservato un valore medio pari a  $38,01 \pm DS 4,7701615$  (quartile inferiore 35,0 – quartile superiore 40,77 – mediana 37,79). Nel secondo box plot (verde) è riportato l’espressione di CK20 nei controlli (n=355) che ha rilevato un valore medio di  $38,34 \pm DS 4,8660415$  (quartile inferiore 35,18 – quartile superiore 45,0 – mediana 37,34). P-value= 0,8337 (Test di Wilcoxon).

Come ultima matrice abbiamo considerato il centrifugato. In questo caso i valori ottenuti per entrambi i marcatori nei campioni tumorali risultano inferiori rispetto ai controlli, con valori per CK7 e per CK20 rispettivamente di 38,11 e di 37,61 nei campioni tumorali, e valori di 41,09 e 42,93 nei campioni di controllo. I dati sono riportati nelle figure 17 e 18.

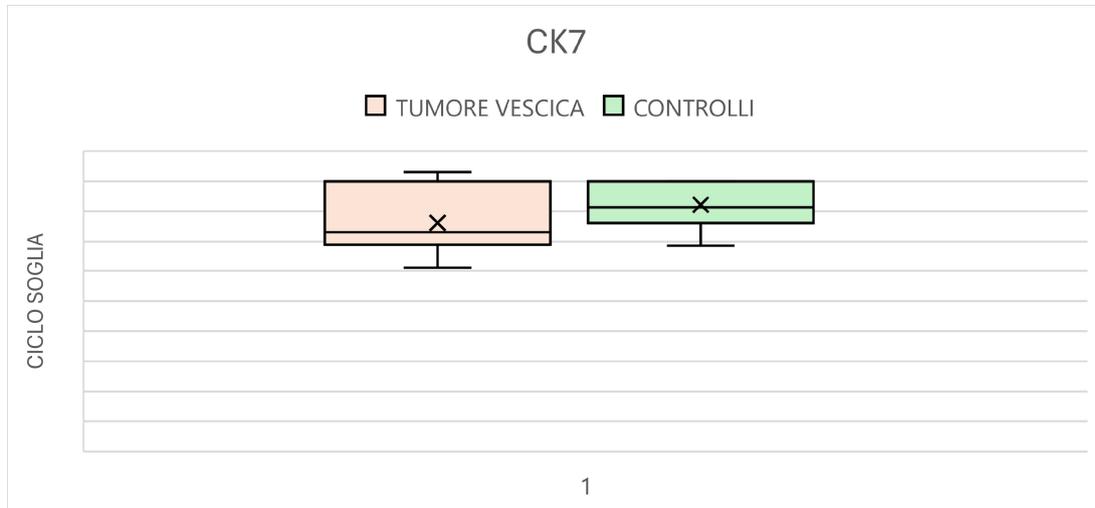


Figura 17. Box plot della variabile matrice centrifugato per il biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK7 espresso nel centrifugato dei campioni tumorali (n=37), è stato osservato un valore medio pari a  $38,11 \pm DS 4,9791914$  (quartile inferiore 34,61 – quartile superiore 45,0 – mediana 36,55). Nel secondo box plot (verde) è riportato l'espressione di CK7 nei campioni di controllo (n=20) che ha rilevato un valore medio pari a  $41,09 \pm DS 3,9680287$  (quartile inferiore 38,05 – quartile superiore 45,0 – mediana 40,69). P-value = 0,0159 (test di Wilcoxon).

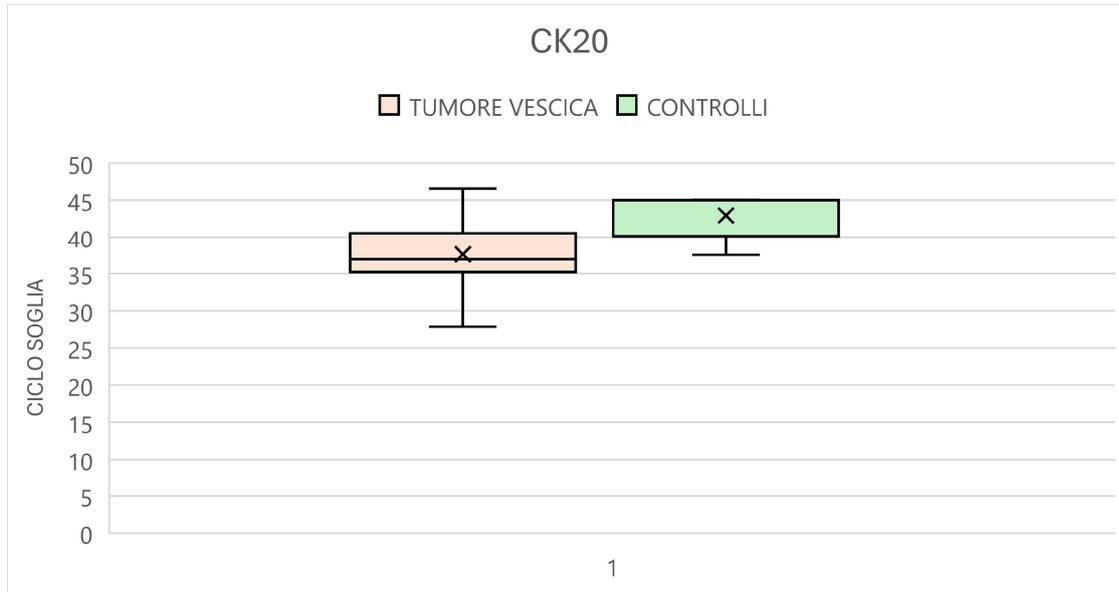


Figura 18. Box plot della variabile matrice centrifugato per il biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa) è riportato CK20 espresso nel centrifugato dei campioni tumorali (n=37), è stato osservato un valore medio pari a  $37,61 \pm DS 4,6282602$  (quartile inferiore 35,46 – quartile superiore 39,93 – mediana 36,92). Nel secondo box plot (verde) è riportato l’espressione di CK20 nei campioni di controllo (n=20) che ha rilevato un valore medio pari a  $42,93 \pm DS 2,8619305$  (quartile inferiore 40,51 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

Per TERT, i dati relativi all’analisi sulla matrice “urine intere” sul paragone tra 50 campioni di tumore di vescica e 400 campioni di controllo sono riportati nella tabella 11. In 11 campioni con tumore alla vescica è stata riscontrata la positività di TERT con una percentuale del 22%, mentre 39 sono risultati negativi al biomarcatore. Per quanto riguarda i controlli, sono stati riscontrati 2 pazienti positivi con una percentuale dello 0,50%, mentre 398 risultano essere negativi al biomarcatore.

| <b>TERT</b>   | <b>TUMORE VESCICA</b> | <b>CONTROLLI</b> | <b>TOTALE</b> |
|---------------|-----------------------|------------------|---------------|
| NO            | 39                    | 398              | 437           |
| SI            | 11                    | 2                | 13            |
| <b>TOTALE</b> | <b>50</b>             | <b>400</b>       | <b>450</b>    |

Tabella 11. Espressione del biomarcatore TERT in campioni di pazienti con tumore di vescica (n=50) e campioni di controllo (n=400) analizzati sulla matrice “urine intere”. La percentuale dei campioni di tumore di vescica positivi al biomarcatore TERT è del 22%. La percentuale su campioni di controlli positivi a TERT è di 0.50% . P-value<0.0001 (test di fisher).

Per l’analisi di TERT sulla matrice “pellet”, i dati sono riportati in tabella 12. Vi è il confronto tra campioni di tumore di vescica (n=69) e campioni di controllo (n=355). Si osserva una positività per il biomarcatore in 12 pazienti con tumore di vescica con una percentuale di positività del 17,39% , mentre 57 campioni sono negativi al biomarcatore. Per i controlli, si osserva una positività in 16 campioni su 355 con una percentuale del 4,51%, mentre 339 campioni sono negativi al biomarcatore.

| <b>TERT</b>   | <b>TUMORE VESCICA</b> | <b>CONTROLLI</b> | <b>TOTALE</b> |
|---------------|-----------------------|------------------|---------------|
| NO            | 57                    | 339              | 396           |
| SI            | 12                    | 16               | 28            |
| <b>TOTALE</b> | <b>69</b>             | <b>355</b>       | <b>424</b>    |

Tabella 12. Espressione del biomarcatore TERT in campioni di pazienti con tumore di vescica (n=69) e campioni di controllo (n=355) analizzati sulla matrice “pellet”. La percentuale dei campioni di tumore di vescica positivi al biomarcatore TERT è del 17,39%. La percentuale su campioni di controlli positivi a TERT è di 4,51% . P-value<0.0001 (test del Chi-quadro).

Per l'analisi di TERT sulla matrice "centrifugato", i dati sono riportati nella tabella 13. Vi è il confronto tra campioni di tumore di vescica (n=37) e campioni di controllo (n=20). Si osserva una positività per TERT su 6 campioni di tumore di vescica con una percentuale di positività al biomarcatore del 16,22% , mentre 31 campioni sono risultati negativi al biomarcatore. Per i controlli, non abbiamo campioni positivi al biomarcatore, tutti i campioni non esprimono il biomarcatore.

| TERT   | TUMORE VESCICA | CONTROLLI | TOTALE |
|--------|----------------|-----------|--------|
| NO     | 31             | 20        | 51     |
| SI     | 6              | 0         | 6      |
| TOTALE | 37             | 20        | 57     |

Tabella 13. Espressione del biomarcatore TERT in campioni di pazienti con tumore di vescica (n=37) e campioni di controllo (n=20) analizzati sulla matrice "centrifugato". La percentuale dei campioni di tumore di vescica positivi al biomarcatore TERT è del 16,22%, mentre non ci sono campioni positivi di controllo per TERT. P-value=0.06 (test di Fisher).

L'ultima variabile presa in considerazione è stata la provenienza dei campioni di controllo, ovvero è stata condotta l'analisi sui campioni provenienti dai reparti ospedalieri e quelli proveniente dal centro prelievi per valutare se ci potessero essere interferenze dovute a diverse patologie. Nei campioni prelevati dal centro prelievi, CK7 ha un valore medio di 42,29, molto simile all'espressione di CK20 che ha un valore di 42,90; nei campioni dei reparti ospedalieri CK7 ha un valore di 39,91, mentre CK20 40,84. I dati sono riportati in figura 16 e 17.

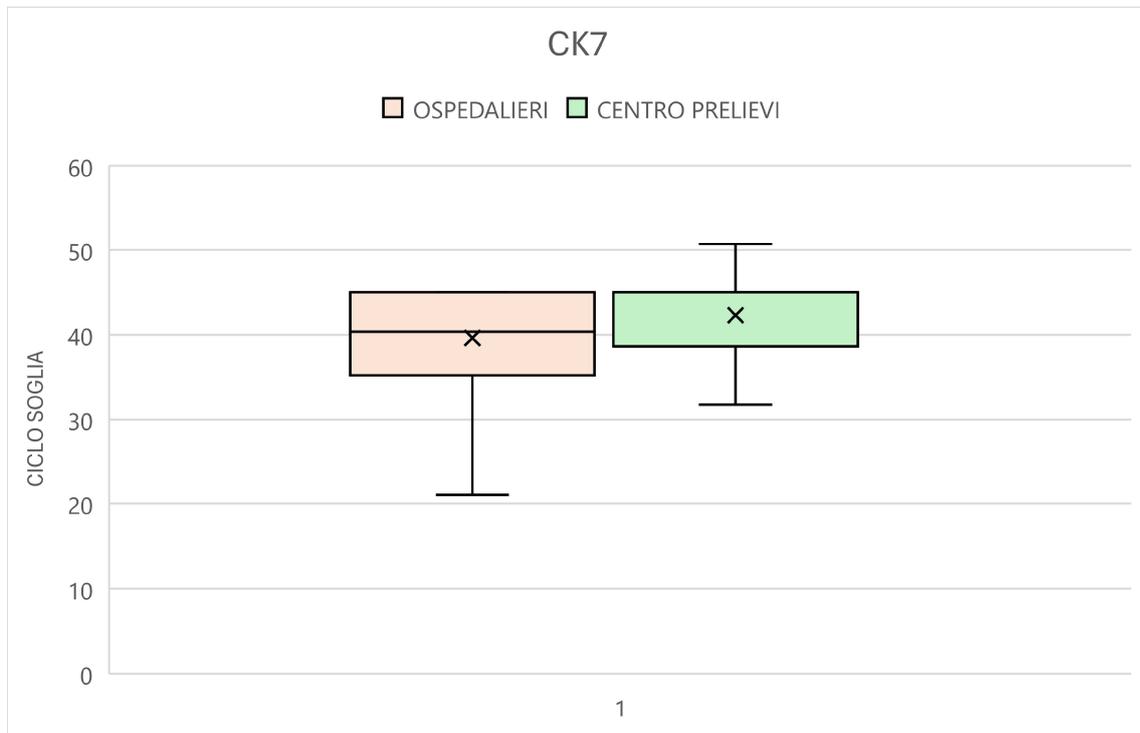


Figura 16. Box plot della variabile provenienza per il biomarcatore CK7. Nel primo box plot (rosa), è riportato CK7 espresso nei campioni dei reparti ospedalieri (n=635), è stato osservato un valore medio pari a  $39,91 \pm DS 5,457446$  (quartile inferiore 35,23 – quartile superiore 45,0 – mediana 40,36). Nel secondo box plot (verde) è riportato l’espressione di CK20 nei campioni provenienti dai centri prelievi (n=140) che ha rilevato un valore medio pari a  $42,29 \pm DS 4,33341$  (quartile inferiore 38,66 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

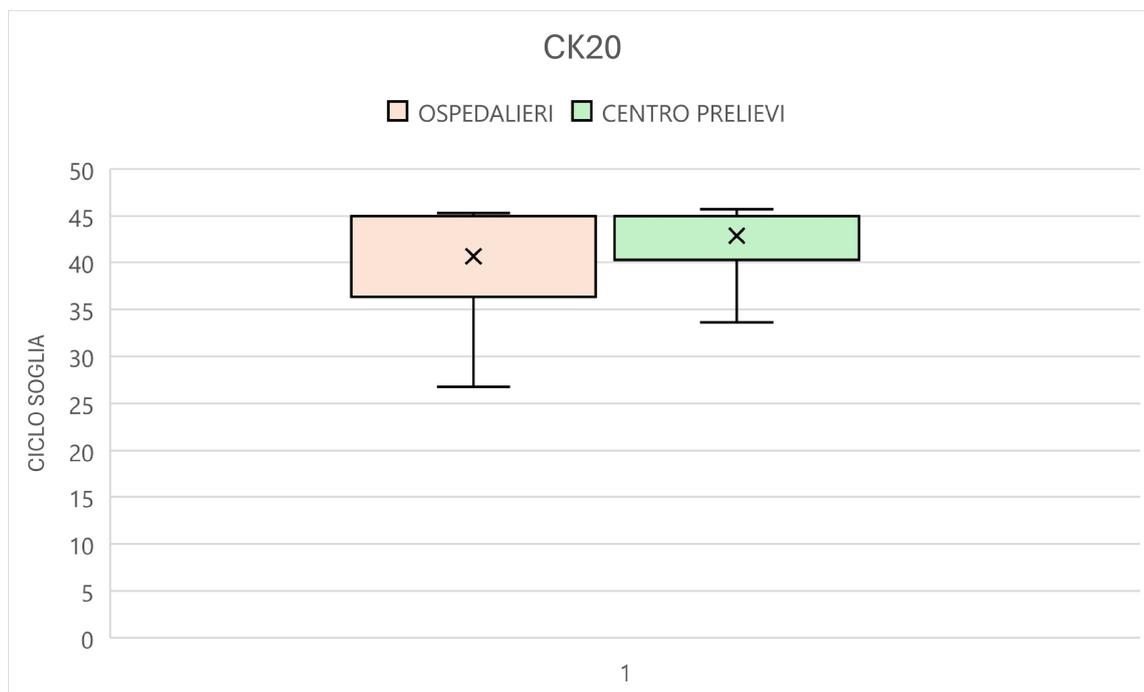


Figura 17. Box plot della variabile provenienza per il biomarcatore CK20. Nel primo box plot (rosa), è riportato CK20 espresso nei campioni dei reparti ospedalieri (n=635), è stato osservato un valore medio pari a  $40,84 \pm DS 5,2413739$  (quartile inferiore 36,32 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). Nel secondo box plot (verde) è riportato l'espressione di CK20 nei campioni provenienti dai centri prelievi (n=140) che ha rilevato un valore medio pari a  $42,91 \pm DS 3,297986$  (quartile inferiore 40,28 – quartile superiore 45,0 – mediana 45,0). P-value < 0,0001 (test di Wilcoxon).

Per l'analisi di TERT sulla variabile provenienza, i dati sono riportati nella tabella 14. Vi è il confronto tra campioni di controllo provenienti dal centro prelievi (n=140) e campioni di controllo provenienti dai reparti ospedalieri (n=635). Si osservano 2 campioni positivi su 140 nei controlli del centro prelievi con una percentuale di positività al biomarcatore del 1,43% , mentre 138 campioni non esprimono il biomarcatore. Per i controlli proveniente dai reparti ospedalieri abbiamo 16 campioni positivi con percentuale di positività al biomarcatore di 2,52%, mentre 619 campioni risultao essere negativi al biomarcatore.

| <b>TERT</b> | <b>CENTRO<br/>PRELIEVI</b> | <b>OSPEDALIERI</b> | <b>TOTALE</b> |
|-------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| NO          | 138                        | 619                | 757           |
| SI          | 2                          | 16                 | 18            |
| TOTALE      | 140                        | 635                | 775           |

Tabella 14. Espressione del biomarcatore TERT in campioni di controllo provenienti da centro prelievi (n=140) e campioni di controllo proveniente dai reparti ospedalieri (n=635). La percentuale dei campioni di controllo provenienti da centro prelievi positivi al biomarcatore TERT è del 1,43%, mentre la percentuale dei campioni di controllo proveniente dai reparti ospedalieri positivi a TERT è di 2,52%. P-value=0.2086 (test di Fisher).

## CAPITOLO 5

### DISCUSSIONE

Nel nostro studio sono stati analizzati tre biomarcatori in diverse popolazioni: campioni tumorali, controlli provenienti dal centro prelievi e controlli provenienti dai reparti ospedalieri. Valutando l'espressione di questi biomarcatori nelle diverse popolazioni, ci siamo proposti di ottimizzare la procedura di raccolta del campione per standardizzarne la metodica rendendola così riproducibile. Inoltre abbiamo utilizzato una metodica automatizzata per l'analisi dei campioni.

Nella diagnosi del tumore della vescica infatti, numerosi studi propongono l'uso di biomarcatori per evitare procedure invasive come la cistoscopia, soprattutto nel monitoraggio dei pazienti. Per questo, a un buon marcatore viene richiesta un'elevata accuratezza. Tuttavia, esistono diverse problematiche legate alla definizione delle performance dei marcatori.

Spesso, i metodi analitici non permettono l'utilizzo di routine dei test, sia a causa della mancanza di automazione, sia per la necessità di lunghe procedure pre-analitiche. Attualmente, l'attenzione è principalmente rivolta all'ottimizzazione della fase pre-analitica, che presenta il maggior numero di errori, soprattutto per via delle procedure manuali. La fase pre-analitica è indispensabile affinché un campione possa essere effettivamente analizzato in laboratorio. Per garantire che un campione sia ottimale per l'analisi, è fondamentale identificare tutte le possibili variabili che potrebbero interferire con il campione e alterarne i risultati. I campioni urinari, in particolare, sono soggetti a variabilità, rendendo necessario definire un Design of Experiment (DoE) prima di sviluppare un campione idoneo all'analisi.

Inoltre è stato dimostrato che spesso un singolo biomarcatore non ha valore diagnostico sufficiente e non fornisce risultati significativi, per questo si sta iniziando a utilizzare la combinazione di più marcatori per migliorare la diagnosi di questo tipo di tumore. La ricerca si sta quindi orientando verso la realizzazione di modelli predittivi che utilizzano pannelli di biomarcatori associati a variabili cliniche.

Questo studio ha avuto l'obiettivo di superare le limitazioni dei test diagnostici attualmente in uso, grazie alla possibilità di utilizzo di una metodica automatizzata per l'analisi dei biomarcatori che renderebbe le procedure analitiche facilmente applicabili alla pratica clinica. A tale scopo, sono state analizzate le performance dell'espressione di tre biomarcatori del carcinoma della

vescica: CK7, CK20 e TERT.

Nel corso di questo studio, tutti i campioni analizzati sono stati raccolti secondo un protocollo standardizzato, dopo la raccolta, sono stati stabilizzati in una soluzione di guanidinio e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi. L'analisi, per ridurre al minimo la variabilità durante l'estrazione dell'mRNA, la retrotrascrizione e l'amplificazione, è stata condotta su una metodica automatizzata: uno strumento chiuso, il Kairos 96 della Nurex SRL. Questo strumento consente di caricare i campioni attraverso rack dedicati e di eseguire la multiplex PCR senza necessità di intervento diretto dell'operatore. Il sistema permette di processare contemporaneamente 96 campioni in singolo o 48 campioni in doppio, rendendo il processo efficiente e adatto per un alto numero di campioni. Successivamente, i dati sono stati sottoposti a un'analisi statistica che ci ha aiutato a interpretare i risultati dei tre biomarcatori in relazione alle diverse variabili considerate. È stato essenziale considerare tutte le variabili che potevano influenzare l'esperimento. L'obiettivo principale è stato, infatti, standardizzare il processo di raccolta dei campioni, in modo da poterli processare senza che le variabili come il timing di raccolta, la matrice urinaria, la provenienza del campione e la miscela specifica utilizzata durante l'analisi possano influenzare i risultati.

Nel nostro studio, la prima variabile presa in considerazione è stata la composizione del controllo positivo da utilizzare come parametro per confrontare i risultati ottenuti nelle sedute di analisi. Abbiamo preparato quindi, un controllo positivo ottenuto mescolando più campioni urinari di pazienti con tumore di vescica di alto grado. Uno studio pilota effettuato in precedenza dal nostro gruppo di ricerca ci aveva consentito di verificare l'espressione dei marcatori in una piccola popolazione di soggetti sani e di pazienti con tumore di vescica di alto grado. Questo campione di controllo ha mostrato un'ottima espressione dei marcatori in alcune preparazioni ed una bassa espressione in altre preparazioni quindi i risultati ottenuti si sono rivelati assai poco riproducibili. Successivamente, abbiamo avuto la possibilità di preparare un controllo positivo utilizzando una linea cellulare di tumore di vescica. Anche se l'espressione dei marcatori si attesta su un valore un po' più basso di quello ottenuto con alcune delle preparazioni urinarie, questi nuovi controlli si sono dimostrati più riproducibili rispetto ai precedenti soprattutto perché provengono da una matrice sempre uguale.

Successivamente abbiamo considerato come variabile il timing di raccolta, confrontando urine di pazienti con tumore vescicale di prima minzione e di seconda minzione. Dai precedenti studi

sappiamo che la prima minzione è generalmente preferibile per l'analisi poiché contiene una concentrazione più elevata di elementi cellulari. Tuttavia, dai nostri risultati per CK7, abbiamo osservato una maggiore espressione nella prima minzione, mentre per CK20 e TERT non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative. Questi risultati, quindi, non sono del tutto in accordo con quanto emerge da altri studi per altri parametri urinari; sarà quindi necessario verificare i dati su un maggior numero di campioni escludendo altre possibili variabili che possono interferire con il dato, come i tempi che intercorrono tra la raccolta del campione e il trasporto al laboratorio per il processamento. Comunque, se questi dati dovessero essere confermati, la possibilità di utilizzare anche le urine di seconda minzione potrebbero rappresentare un vantaggio clinico, in quanto i campioni urinari non dovrebbero necessariamente essere raccolti a casa dai pazienti con sospetto tumore di vescica ma potrebbero essere raccolti direttamente nel centro prelievi e questo faciliterebbe eventuali procedure di screening.

Per quanto riguarda la variabile matrice è fondamentale stabilire la condizione migliore per l'analisi. È importante considerare che in questo caso, dal momento che si analizza l'espressione di alcuni marcatori, il campione di urine deve contenere delle cellule al suo interno, per cui è bene scegliere la matrice che permette di ottenere la maggiore percentuale di cellule possibile. Delle tre matrici considerate possiamo osservare dai risultati come sia per l'urina intera, sia per il pellet che per il centrifugato, l'espressione dei marcatori risulti maggiore nei campioni di tumore di vescica rispetto ai controlli. Relativamente a CK7, quando la matrice utilizzata è l'urina intera, si osserva una maggiore espressione del marcatore all'interno dei campioni di tumore della vescica rispetto ai controlli, così come per CK20; per entrambi è stata dimostrata una significatività statistica. Dai risultati ottenuti analizzando la matrice "pellet", si osserva, invece, come per CK7 sia presente una differenza di espressione tra i campioni di tumore della vescica, in cui risulta più espressa, e i campioni di controllo, con una significatività statistica; per CK20 non si osserva questa differenza, perché i valori sono molto simili tra le due popolazioni, per cui non si osserva una differenza statisticamente significativa. Infine, si è deciso di valutare l'uso del campione centrifugato; anche qui i dati ottenuti indicano che l'espressione sia di CK7 che di CK20 risulti maggiore in campioni di tumore di vescica, con una significatività statistica. Per quanto riguarda il marcatore TERT, la differenza di espressione è stata valutata tra

tumori e controlli, nelle tre matrici. Abbiamo osservato differenze significative dell'espressione nella matrice urine intere e nella matrice pelet ma non nella matrice centrifugato. I dati ottenuti indicano quindi che le differenze significative tra tumori e controlli sono presenti per tutti e tre i marcatori solo nella matrice urine intere ossia il campione intero non centrifugato e non pellettato.

La possibilità di utilizzare le urine intere non centrifugate è sicuramente un vantaggio. Manipolare meno il campione riduce il rischio di variabilità e semplifica il processo complessivo. Inoltre, questa scelta permette di automatizzare ulteriormente la procedura: dopo il trattamento per l'analisi del sedimento urinario, i campioni possono essere trasferiti direttamente nel macchinario per l'estrazione dell'RNA e l'analisi, senza bisogno di ulteriori manipolazioni da parte dell'operatore. Questa automazione non solo migliora l'efficienza del processo, ma riduce anche il rischio di errori umani, rendendo le analisi più riproducibili e affidabili. Pertanto, utilizzare le urine intere come matrice preferita rappresenta un passo importante verso una metodologia di laboratorio più efficiente e accurata nella ricerca del tumore della vescica.

Abbiamo esaminato infine la provenienza dei campioni come un'altra variabile nel nostro studio per valutare possibili interferenze di altre patologie. Abbiamo quindi confrontato campioni provenienti dal centro prelievi e campioni provenienti dai reparti ospedalieri. Questo è stato importante perché i campioni provenienti dai reparti ospedalieri potrebbero appartenere a pazienti con pluripatologie, che potrebbero influenzare l'espressione dei biomarcatori nell'analisi.

Abbiamo osservato che CK7 e CK20 erano meno espressi nei campioni provenienti dal centro prelievi rispetto a quelli ospedalieri, con un'elevata significatività statistica. Anche TERT appariva più espresso nei campioni ospedalieri, ma in questo caso, la differenza non era statisticamente significativa. Entrambi i gruppi di provenienza differivano comunque in maniera statisticamente significativa rispetto ai campioni tumorali, con maggiori differenze riscontrate nel confronto con i campioni provenienti dal centro prelievi. Questo dato è coerente con il fatto che nei reparti ospedalieri ci sono pazienti con pluripatologie più gravi, che possono interferire con l'espressione dei biomarcatori.

Il fatto che le differenze con i campioni di tumore della vescica si mantengano molto alte per entrambi i gruppi di controllo suggerisce che i marcatori presentano buone performance e potrebbero essere utilizzati efficacemente in future applicazioni su diverse popolazioni. Questo rafforza la validità dei biomarcatori considerati nel nostro studio per la diagnosi del tumore della vescica.

## **CAPITOLO 6**

### **CONCLUSIONI**

La possibilità di utilizzare una metodica di diagnosi basata sui marcatori per evitare metodiche invasive per il tumore della vescica è certamente auspicabile. In questo studio abbiamo valutato diverse variabili che possono influenzare la fase pre-analitica e abbiamo cercato di stabilire le migliori condizioni di raccolta e processamento del campione al fine di rendere la metodica riproducibile e ridurre al minimo gli errori associati a questa fase, così da poter utilizzare la metodica nella pratica clinica. Sono state stabilite le condizioni più favorevoli rispetto ai dati ottenuti, per cui saranno certamente necessari ulteriori studi su casistiche più ampie per confermare questi risultati. Inoltre, sarà certamente necessaria una valutazione delle altre variabili associate alla fase pre-analitica, che possono influenzare i risultati ottenuti e che non sono state considerate in modo dettagliato in questo studio, quali la temperatura di conservazione e la stabilità dei campioni nel caso di analisi non eseguite immediatamente, gli effetti di trattamenti farmacologici in atto al momento della raccolta, l'uso di campioni raccolti da soggetti con catetere vescicale o insufficienza renale, l'influenza di condizioni flogistiche a carico delle vie urinarie.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. Neogi SS, Mehndiratta M, Gupta S, Puri D. *J Clin Sci Res.* 2016, The preanalytical phase - past, present and future. Cornes M. *Ann Clin Biochem.* 2020;
- 2) Nordin N, Ab Rahim S, Wan Omar W, et al. (March 30, 2024) Preanalytical Errors in Clinical Laboratory Testing at a Glance: Source and Control Measures. *Cureus* 16.
- 3) Errors within the total laboratory testing process, from test selection to medical decision-making - a review of causes, consequences, surveillance and solutions. Mrazek C, Lippi G, Keppel MH, Felder TK, Oberkofler H, Haschke-Becher E, Cadamuro J. *Biochem Med (Zagreb)* 2020;
- 4) Preanalytical errors and their impact on tests in clinical laboratory practice. Naz S, Mumtaz A, Sadaruddin A. *Pak J Med Res.* 2012;
- 5) Standardization of collection requirements for fasting samples: for the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M. *Clin Chim Acta.* 2014.
- 6) Preanalytical Errors in Clinical Laboratory Testing at a Glance: Source and Control Measures Nani Nordin , Siti Nadirah Ab Rahim , Wan Farhana Azwanee Wan Omar , Sarah Zulkarnain , published 03/30/2024.
- 7) The preanalytical phase – from an instrumentcentred to a patient-centred laboratory medicine, Janne Cadamuro and Ana-Maria Simundic, published online November 4, 2022).
- 8) MDPI and ACS Style Milić, N.; Milanović, M.; Drljača, J.; Sudji, J.; Milošević, N. Challenges in the Analytical Preparation of a Biological Matrix in Analyses of Endocrine-Disrupting Bisphenols. *Separations* 2023 - Challenges in the Analytical Preparation of a Biological Matrix in Analyses of Endocrine-Disrupting Bisphenols.
- 9) Flaig, T. W. et al. Bladder Cancer, 2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* (2020)); Ploeg, M. et al. Discrepancy between

- clinical staging through bimanual palpation and pathological staging after cystectomy. *Urol. Oncol.* (2012).
- 10) Barkan, G. A. et al. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Adv. Anat. Pathol.* (2016).
  - 11) Nikas, I. P. et al. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: A Meta-Analysis. *J Pers Med* (2022).
  - 12) Moch, H. *Urinary and Male Genital Tumours : WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 8.* (IARC Publications, 2022).
  - 13) Bladder cancer symptoms. (n.d.). National Cancer Institute. Published February 16, 2023.
  - 14) Yahyazadeh R, Bashash D, Ghaffari P, Kord S, Safaroghli-Azar A, Ghaffari SH. Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. *BMC Urol.* 2021 Apr 19.
  - 15) Maas M, Todenhöfer T, Black PC. Urine biomarkers in bladder cancer - current status and future perspectives. *Nat Rev Urol.* 2023 Oct;20. Epub 2023 May 24.
  - 16) Bruch, P. G., Plage, H., Hofbauer, S., Kornienko, K., Weinberger, S., Roßner, F., Schallenberg, S., Kluth, M., Lennartz, M., Blessin, N. C., Marx, A. H., Samtleben, H., Fisch, M., Rink, M., Slojewski, M., Kaczmarek, K., Ecke, T., Hallmann, S., Koch, S., Adamini, N., Elezkurtaj, S. (2023). Cytokeratin 20 expression is linked to stage progression and to poor prognosis in advanced (pT4) urothelial carcinoma of the bladder. *Experimental and molecular pathology.*
  - 17) Jiang J, Ulbright TM, Younger C, Sanchez K, Bostwick DG, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jul.
  - 18) Hosen MI, Sheikh M, Zvereva M, Scelo G, Forey N, Durand G, Voegelé C, Poustchi H, Khoshnia M, Roshandel G, Sotoudeh M, Nikmanesh A, Etemadi A, Avogbe PH, Chopard P, Delhomme TM, Foll M, Manel A, Vian E, Weiderpass E, Kamangar F, Boffetta P, Pharaoh PD, Dawsey SM, Abnet CC, Brennan P, McKay J. Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine.* 2020 Mar.

## **SITOGRAFIA**

19) <https://biomedia.net/5609/>

20) <https://www.sipmel.it/it/riviste/articolopdf.php/261>

21) <https://www.mypathologyreport.ca/it/pathology-dictionary/cytokeratins/>

22) <https://learning.acsgcipr.org/process-design/design-of-experiments/the-experimental-design-process/>

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare prima di tutto il Dottor Giulio Mengozzi per avermi dato questa opportunità e per avermi guidato nel processo di stesura della tesi. Un ringraziamento speciale va anche alla professoressa Giuliana Giribaldi per la disponibilità e professionalità dimostrata durante il mio percorso di tirocinio, il suo sostegno e la sua competenza sono state fondamentali per la realizzazione di questo elaborato. Desidero ringraziare l'ospedale Molinette, in particolare tutto il personale del laboratorio Baldi e Riberi, per l'ospitalità durante il mio periodo di tirocinio. Un ringraziamento va a Selene Limocelli per la sua costante disponibilità nei confronti dei tirocinanti, e a Chiara Fiameni e Claudia Filippini per il loro prezioso aiuto nella ricerca e nella stesura della tesi.

Inoltre, ringrazio il mio relatore Elia Ranzato per il suo indispensabile contributo nella stesura della tesi, la sua competenza e il suo supporto sono stati fondamentali per migliorare la qualità del mio lavoro.

Infine, desidero ringraziare le mie colleghe e amiche Chiara e Rebecca per il loro costante supporto durante questo percorso, abbiamo affrontato insieme sia le difficoltà che i successi e vi sono profondamente grata per esserci sempre state.